UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Sistemas de esterilização por plasma: estudos
de compatibilidade em polímeros e eficácia
esterilizante em produtos médico-hospitalares
de calibres reduzidos e longa extensão

Débora Cristina de Oliveira

Tese para obtenção do grau de doutor

Orientadora:

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Sistemas de esterilização por plasma: estudos
de compatibilidade em polímeros e eficácia
esterilizante em produtos médico-hospitalares
de calibres reduzidos e longa extensão

Débora Cristina de Oliveira

Tese para obtenção do grau de doutor

Orientadora:

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

Elaboração pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

O48s Oliveira, Débora Cristina de
Sistemas de esterilização por plasma: estudos de compatibilidade em polímeros e eficácia esterilizante em produtos médico-hospitalares de calibres reduzidos e longa extensão / Débora Cristina de Oliveira -- São Paulo, 2007.
204 p.
Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Microbiologia aplicada 2. Esterilização industrial 3. Polímeros: Aplicação na medicina 4. Material biomedical: Biocompatibilidade: Medicina I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

660.6 CDD

Débora Cristina de Oliveira

Sistemas de esterilização por plasma: estudos de compatibilidade em
polímeros e eficácia esterilizante em produtos médico-hospitalares de
calibres reduzidos e longa extensão

**Comissão Julgadora da Tese para
obtenção do grau de Doutor**

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Yoshio Kawano
1º Examinador

Profa. Dra. Áurea Silveira Cruz
2º Examinador

Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto
3º Examinador

Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer
4º Examinador

São Paulo, 19 de março de 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Débora Cristina de Oliveira no Programa: Fármaco e Medicamentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 19 dias do mês de março de 2007, no(a) auditório realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Débora Cristina de Oliveira, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Fármaco e Medicamentos - Área: Produção e Controle Farmacêuticos, intitulada:

"Sistemas de esterilização por plasma: Estudos de compatibilidade em polímeros e eficácia esterilizante em produtos médico-hospitalares de calibres reduzidos e longa extensão"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto	Presidente	FCF - USP	APROVADA
Yoshio Kawano	Titular	IQ - USP	APROVADA
Dominique Corinne Hermine Fischer	Titular	FCF - USP	APROVADA
Aurea Silveira Cruz	Titular	Sem Vínculo - Externo	APROVADA
Célia Hitomi Yamamoto	Titular	UFJF - Externo	APROVADA
Resultado Final: <i>APROVADA</i>			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Elisabete Claro de Souza Paiva *Elisabete Claro de Souza Paiva*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as), São Paulo, aos 19 dias do mês de março de 2007.

Yoshio Kawano
Yoshio Kawano

Dominique C H Fischer
Dominique Corinne Hermine Fischer

Aurea Silveira Cruz
Aurea Silveira Cruz

Célia Hitomi Yamamoto
Célia Hitomi Yamamoto

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 19/03/2007

**Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não
fazer algo só depende de nossa boa vontade e perseverança!**

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

À minha família por todo o amor e por sempre me apoiar e incentivar em todas as decisões da minha vida.

Ao meu companheiro Guillermo, por todo o amor e por ter tido a paciência necessária quando mais precisei.

À minha orientadora Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto por mais uma vez estar ao meu lado sabiamente orientando e incentivando meu crescimento pessoal e profissional.

À Deus, por ter permitido que eu superasse inúmeras dificuldades e por ter me dado a luz, a força e a disciplina que foram essenciais para a conclusão de mais esta etapa de minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento à todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, e em especial à:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade e funcionários Elisabete Claro de Souza Paiva, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima por toda ajuda e atenção dispensadas.

Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro na divulgação internacional do trabalho de pesquisa na cidade de Montreal, Canadá.

Prof. Dr. Ronaldo Domingues Mansano pelas valiosas contribuições e pelo uso dos equipamentos de Plasma do Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da USP.

Colegas do Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da USP Nelson Ordonez, Alexandre Camponucci, José Antônio R. Porto, Elísio José de Lima e em especial Adir José Moreira, por toda a ajuda com os equipamentos de plasma e assuntos relacionados, mas principalmente pela inestimável amizade.

Prof. Dr. Yoshio Kawano, do Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP, pela valiosa contribuição na geração e interpretação dos dados relacionados à espectroscopia fotoacústica no infravermelho, bem como pela delicadeza e pronta disponibilidade em me ajudar.

Dra. Áurea Silveira Cruz, da Seção de Culturas celulares do Instituto Adolfo Lutz, pela pronta disponibilidade e por toda a ajuda relacionada aos ensaios biológicos de citotoxicidade.

Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da USP, e em especial à técnica do laboratório Fernanda de Sá Teixeira, pelo uso do microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6460LV.

TODOS os colegas do Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo companheirismo durante esta caminhada, e em especial à Renata Rabelo Soriani e Michelle Rigamonte Boscariol, por todo o carinho e sincera amizade.

Profa. Dra. Telma Mary Sakuda Kaneko e José de Souza Sobrinho do Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela amizade e disponibilidade para ajudar, não só no âmbito profissional, mas em todos os momentos

Estagiários Fernando Adas Pereira Vitalli e Aline Moraes de Oliveira, pessoas fantásticas e imprescindíveis em distintos momentos do trabalho.

TODOS os colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as respectivas matérias-primas (CONFAR) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por toda colaboração na execução do presente trabalho

Bibliotecários Adriana de Almeida Barreiros, Ângelo Antônio A. C. da Cruz e Leila Aparecida Bonadio da biblioteca do Conjunto das Químicas por toda a ajuda e pela revisão das Referências Bibliográficas

Secretárias da Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Rose Clélia Dedivitis e Maria de Fátima S. G. Morashashi por toda a atenção e colaboração prestadas.

RESUMO

Recentes avanços nas ciências médicas têm contribuído significativamente para que novas tecnologias de materiais e processos tecnológicos ganhem espaço. No âmbito da esterilização de materiais poliméricos termossensíveis, empregados na fabricação de ampla gama de produtos médico-hospitalares, os processos que operam sob temperaturas compatíveis com estes materiais, gás óxido de etileno e radiação ionizante, agregam desvantagens importantes envolvendo, respectivamente, aspectos de toxicidade ocupacional, ambiental e ao paciente, bem como alterações intrínsecas aos mesmos. O processo inovador e potencialmente compatível por gás plasma representa promissora alternativa, onde o agente letal agrega entidades altamente reativas provenientes de gás ionizado por aplicação de descarga elétrica e originalmente desprovido de atividade microbida. O presente trabalho teve por objetivo proceder a estudos que permitam conhecimento da eficácia esterilizante de processos empregando plasma de O₂ puro e sua mistura com H₂O₂ em produtos médico-hospitalares de natureza polimérica, configuração tubular, longa extensão e calibre reduzido. Os *lumens* desses materiais foram preenchidos com suportes vítreos (lamínulas de 8 x 18mm) intencionalmente contaminados com biocargas restritas de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, que atuaram como biosensores, constituindo os monitores biológicos. Esses dispositivos foram submetidos a ciclos por plasma sob distintas combinações de parâmetros envolvendo distintos sistemas (RIE e ICP), potências de rádio-freqüência e tempos de exposição sub-letais. Após os ciclos esterilizantes, os monitores biológicos foram abertos e submetidos à análise microbiológica para a enumeração de possíveis esporos sobreviventes, usando o método do número mais provável (NMP), possibilitando o cálculo dos valores D (principal parâmetro de resistência de uma população microbiana). Adicionalmente, foram objeto de investigação polímeros distintos utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares, a fim de esclarecer a influência do plasma sobre as características intrínsecas desses materiais. Foram selecionados o poli (cloreto de vinila) - PVC, polietileno de alta densidade (HDPE), polipropileno (PP), poliuretano (PUR) e policarbonato (PC). As amostras foram expostas em ambos sistemas de

plasma (RIE e ICP) usando gás O_2 puro e sua mistura gasosa O_2/H_2O_2 , potências de RF de 150W e 300W e tempo de exposição de 30 min. As amostras foram submetidas a espectroscopia fotoacústica no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, microanálise e perfilometria a fim de avaliar possíveis danos aos polímeros expostos, assim como citotoxicidade *in vitro* para esclarecer sobre a biocompatibilidade dos mesmos. Os resultados demonstraram que a eficácia esterilizante do plasma foi dependente do calibre dos monitores biológicos e das potências de RF aplicadas. Os menores valores D foram obtidos para os monitores biológicos de maior calibre (7mm) e potências de 150W/300W em ambos sistemas RIE e ICP, respectivamente. A mistura gasosa O_2/H_2O_2 apresentou maior efeito microbicida quando comparada ao O_2 puro em ambos sistemas de plasma. Paralelamente, a exposição ao plasma levou à modificação em nível superficial (oxidação e aumento da rugosidade) para todos os polímeros expostos. Foi observado efeito mais agressivo quando usando plasma gerado em sistema ICP usando mistura gasosa O_2/H_2O_2 . Os dados sugerem que a massa interna ou *bulk* de todas as amostras não foi afetada, assim como as alterações observadas não promoveram modificação na biocompatibilidade dos polímeros estudados.

Palavras-chave: esterilização por plasma, monitor biológico, biomateriais, compatibilidade de polímeros, espectroscopia no infravermelho, eficácia.

ABSTRACT

Plasma sterilization: study of polymer compatibility and sterilization effectiveness in long and narrow lumen medical devices.

The sterilization of heat sensitive materials like medical devices made of polymers has been under intense investigation regarding new technologies and sterilization agents, as far as mechanical problems and innocuity of currency processes such as ionizing radiation and ethylene oxide gas, respectively, are concerned. Plasma sterilization of medical devices is emerging as an attractive substitute to conventional sterilization technologies, once is recognized as an atoxic and low-temperature process. It uses different gases that are activated by an electrical discharge, generating reactive species which promote lethal effect on microorganisms. In this work, it was performed experimental studies to evaluate the sterilization effectiveness of pure O₂ and O₂/H₂O₂ mixture gas plasma against a standard load of 10³ *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 spores inoculated on 8 x 18mm glass carriers placed inside and in central position of PVC catheters 64cm long with internal diameters of 7mm and 1mm. These assemblages simulated the challenge of medical devices as biological monitors. The gas plasma sterilization efficiency was studied as a function of plasma systems (RIE and ICP), radio frequency powers and sub-lethal exposition times. After sterilization, the biological monitors were disassembled and the survivors were growth in trypticase soy broth using the most probable number (MPN) technique. Hence, it was possible to calculate the time D required to decrease a given population by a factor of 10 (90% reduction). On the other hand, there was a need to evaluate the safety of plasma sterilization in terms of polymer damage. Materials used in this study were: polyvinylchloride (PVC), high density polyethylene (HDPE), polypropylene (PP), polyurethane (PUR) and polycarbonate (PC). Samples were exposed to pure O₂ and O₂/H₂O₂ plasma sterilization using both plasma systems (RIE and ICP), radio frequency powers of 150W/300W and exposition time of 30 minutes. Fourier transform infrared

photoacoustic spectroscopy (FT-IR/PAS), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and profilometry, which are surface and bulk characterization techniques, were used to study plasma sterilization polymers compatibility, as well as “in vitro” cytotoxicity to assess the biocompatibility of exposed polymers. The results demonstrated that plasma antimicrobial activity depended on the inside catheters diameter and radio frequency powers. The smallest D values were obtained when using biological monitors of 7mm of internal diameter and 150W/300W of RF powers, in, respectively, RIE/ICP systems. The mixture O_2/H_2O_2 exhibited higher microbicidal efficacy than pure O_2 in both plasma systems. In addition, both plasma systems led to near-surface layers modification, with the increase of roughness and surface oxidation of all the polymers studied. ICP system and O_2/H_2O_2 mixture were more effective to induce the surface modifications observed. The bulk of all polymers showed not to be affected by all plasma conditions used and the surface alterations did not affect the biocompatibility of all the polymers studied.

Keywords: plasma sterilization, biological monitor, biomaterials, polymer compatibility, infrared spectroscopy, efficacy.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Composição do ágar para esporulação do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372	47
Tabela 2. Curva de calibração da vazã'o de H ₂ O ₂ em função da pressão e vazão do O ₂ no interior da câmara	67
Tabela 3. Grau de esporulação entre o 1° e o 12° dias, em valores percentuais (%), do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 quando inoculado nos grupos de garrafas G1 (garrafas 1 a 8) e G2 (garrafas 1 a 8).....	80
Tabela 4. Grau de esporulação entre o 1° e o 12° dias, em valores percentuais (%), do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 quando inoculado nos grupos de garrafas G3 (garrafas 1 a 8) e G4 (garrafas 1 a 8).....	81
Tabela 5. Padronização do número de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 no <i>pool</i> obtido a partir dos grupos de garrafas G1, G2, G3 e G4.....	82
Tabela 6. Valores de contagem, utilizando técnica de filtração esterilizante, de cerca de 10 ³ esporos/20µL de <i>Bacillus subtilis</i> var <i>niger</i> ATCC 9372 inoculados em solução aquosa ..	85
Tabela 7. Valores de contagem, utilizando técnica de filtração esterilizante, de cerca de 10 ³ esporos/20µL de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos	85
Tabela 8. Valores de contagem, utilizando técnica dos tubos múltiplos ou número mais provável (NMP), de cerca de 10 ³ esporos/20µL de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 inoculados diretamente em 10mL de caldo caseína-soja e em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos	86
Tabela 9. Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE), potência de rádio frequência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 200sccm, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	88

Tabela 10.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE), potência de rádio frequência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 200sccm, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60 ⁰ C	89
Tabela 11.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE), potência de rádio frequência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 160sccm e 40sccm, respectivamente, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60 ⁰ C	90
Tabela 12.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE), potência de rádio frequência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 160sccm e 40sccm, respectivamente, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60 ⁰ C	91
Tabela 13.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP), potência de rádio frequência de 10W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 200sccm, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60 ⁰ C	92
Tabela 14.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP), potência de rádio frequência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 200sccm, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60 ⁰ C	93

Tabela 15.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP), potência de rádio frequência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 160sccm e 40sccm, respectivamente, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	94
Tabela 16.	Valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB -A e MB -B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP), potência de rádio frequência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, vazão de gás de 160sccm e 40sccm, respectivamente, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	95
Tabela 17.	Valores de redução decimal (valor D) em min de todas as variáveis estudadas para os sistemas de esterilização por plasma obtido com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE), sendo constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), umidade relativa (cerca de 30%) e temperatura (inferior a 60°C)	105
Tabela 18.	Valores de redução decimal (valor D) em min de todas as variáveis estudadas para os sistemas de esterilização por plasma de alta densidade obtido com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP), sendo constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), umidade relativa (cerca de 30%) e temperatura (inferior a 60°C)	106
Tabela 19.	Resultados relativos à rugosidade média (Ra) em nm e a rugosidade pico a pico (Rt) em nm obtidos para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) para as combinações de parâmetros usadas ..	120
Tabela 20.	Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PVC através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).....	122

Tabela 21.	Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o HDPE através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).....	123
Tabela 22.	Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PP através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).....	124
Tabela 23.	Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PUR através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).....	125
Tabela 24.	Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PC através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).....	126

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PVC	25
Figura 2. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do HDPE	25
Figura 3. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PP	26
Figura 4. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PUR	28
Figura 5. Desenho esquemático do PC em uma de suas denominações comerciais, o Lexan®	29
Figura 6. Equipamento de deposição de ouro marca Edwards, modelo “sputter coater 5150B”	51
Figura 7. Microscópio eletrônico de varredura marca Phillips®, modelo SEM 515	51
Figura 8. Sistema filtrante Sterifil® acoplado à bomba de vácuo Millipore®	53
Figura 9. Placa de Petri contendo ágar caseína soja e membrana esterilizante de 47mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45µm, após 24h de incubação.....	54
Figura 10. Monitor biológico A (MB-A)	55
Figura 11. Monitor biológico B (MB-B)	55
Figura 12. Monitor biológico A (MB-A) inseridos no interior de placas de Petri de alumínio	57
Figura 13. Monitor biológico B (MB-B) inseridos no interior de placas de Petri de alumínio	58
Figura 14. Esquema de diluições decimais seriadas do método de contagem microbiana por tubos múltiplos ou número mais provável (NMP)	60
Figura 15. Sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE)	62
Figura 16. Desenho esquemático das variáveis de pressão aplicadas para os processos de plasma executados	63
Figura 17. Sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP)	64

	Pág.
Figura 18. Microscópio eletrônico de Varredura (SEM) JEOL 6460LV.....	72
Figura 19. Distintos polímeros fragmentados em tamanhos irregulares de cerca de 1mm x 1mm posicionados sobre o porta-amostra (25 fragmentos)	73
Figura 20. Desenho esquemático da coluna de alto vácuo do microscópio eletrônico de varredura (SEM) JEOL 6460LV.....	73
Figura 21. Relação entre a altura medida (h) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira (y)	75
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura da alíquota de 20 μ L com cerca de 10 ³ esporos inoculada em suportes vítreos de 8 x 18mm sob aumento de 1.420 vezes	82
Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura da alíquota de 20 μ L com cerca de 10 ³ esporos inoculada em suportes vítreos de 8 x 18mm sob aumento de 5.700 vezes	83
Figura 24. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm(100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	97
Figura 25. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	97
Figura 26. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	98

Figura 27.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	98
Figura 28.	Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	99
Figura 29.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	99
Figura 30.	Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	100
Figura 31.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	100

Figura 32.	Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo planar modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	101
Figura 33.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	101
Figura 34.	Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	102
Figura 35.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	102
Figura 36.	Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	103

Figura 37.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	103
Figura 38.	Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	104
Figura 39.	Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C	104
Figura 40.	Espectros de radiação infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PVC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O ₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O ₂ ; RIE-O ₂ + H ₂ O ₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂ ; ICP-O ₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O ₂ ; ICP-O ₂ + H ₂ O ₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂)	108
Figura 41.	Espectros de radiação infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de HDPE (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O ₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O ₂ ; RIE-O ₂ + H ₂ O ₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂ ; ICP-O ₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O ₂ ; ICP-O ₂ + H ₂ O ₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂)	109

Figura 42.	Espectros de radiação infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PP (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O ₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O ₂ ; RIE-O ₂ + H ₂ O ₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂ ; ICP-O ₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O ₂ ; ICP-O ₂ + H ₂ O ₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂).....	110
Figura 43.	Espectros de radiação infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PUR (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O ₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O ₂ ; RIE-O ₂ + H ₂ O ₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂ ; ICP-O ₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O ₂ ; ICP-O ₂ + H ₂ O ₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂).....	111
Figura 44.	Espectros de radiação infravermelha obtidos em equipamento BOMEM PCDA para cinco amostras de PC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O ₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O ₂ ; RIE-O ₂ + H ₂ O ₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂ ; ICP-O ₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O ₂ ; ICP-O ₂ + H ₂ O ₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂).....	112
Figura 45.	Fotomicrografias do PVC obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 37.000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) PVC não exposto; b) PVC exposto ao plasma em sistema RIE e gás O ₂ ; c) PVC exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂ ; d) PVC exposto ao plasma em sistema ICP e gás O ₂ ; e) PVC exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂	114
Figura 46.	Fotomicrografias do HDPE obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 5.000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) HDPE não exposto; b) HDPE exposto ao plasma em sistema RIE e gás O ₂ ; c) HDPE exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂ ; d) HDPE exposto ao plasma em sistema ICP e gás O ₂ ; e) HDPE exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂	115

	Pág.
Figura 47. Fotomicrografias do PP obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 37.000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) PP não exposto; b) PP exposto ao plasma em sistema RIE e gás O ₂ ; c) PP exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂ ; d) PP exposto ao plasma em sistema ICP e gás O ₂ ; e) PP exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂	116
Figura 48. Fotomicrografias do PUR obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 37.000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) PUR não exposto; b) PUR exposto ao plasma em sistema RIE e gás O ₂ ; c) PUR exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂ ; d) PUR exposto ao plasma em sistema ICP e gás O ₂ ; e) PUR exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂	117
Figura 49. Fotomicrografias do PC obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 1.000 vezes {a, b, c, d, e}. a) PC não exposto; b) PC exposto ao plasma em sistema RIE e gás O ₂ ; c) PC exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂ ; d) PC exposto ao plasma em sistema ICP e gás O ₂ ; e) PC exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa O ₂ + H ₂ O ₂	118
Figura 50. Placas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizada no método de difusão em ágar, mostrando o halo claro ao redor do controle positivo (a) e ausência de halo ao redor ou sob o controle negativo (b).....	127
Figura 51. Fotomicrografia em 100 vezes do controle positivo, mostrando as monocamadas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizada no método de difusão em ágar, apresentando as células coradas e as células claras e lisadas caracterizadas pela presença do efeito tóxico (não absorvem o corante vital)	127

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição sub-letais dos monitores biológicos em sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> - RIE (triplicata de ciclos)	65
Quadro 2. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição sub-letais dos monitores biológicos em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> – ICP (triplicata de ciclos)	66
Quadro 3. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição das amostras dos polímeros em sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo <i>Reactive Ion Etching</i> – RIE (triplicata de ciclos)	69
Quadro 4. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição das amostras dos polímeros em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo <i>Inductively Coupled Plasma</i> - ICP (triplicata de ciclos)	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
ATCC	American Type Culture Collection
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> e reflectância total atenuada
ATV	Associação de tripsina 0,20% e versene 0,02%
Bulk	Massa interna do polímero
CFC	Clorofluorcarbono
NCTC clone 929	Cultura de células de tecido conjuntivo de camundongo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBD	Descarga de Barreira Dielétrica
DC glow discharge	Descarga elétrica direta
DCA	Medida de ângulo de contato
DOP	Dioctil ftalato
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
EPCs	Equipamentos de Proteção Coletiva
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
EtO	Óxido de Etileno
FIR	Infravermelho distante
HCFC	Hidroclorofluorcarbono
HDPE	Polietileno de alta densidade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IB's	Indicadores Biológicos
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
ICP-O₂	Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O ₂
ICP-O₂ + H₂O₂	Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂
IR	Infravermelho
ISO	International Organization for Standardization
IV	Radiação infravermelha

IZ	Índice de zona
LDPE	Polietileno de baixa densidade
MB-A	Monitor biológico A
MB-B	Monitor biológico B
MEM	Meio mínimo de Eagle
MIR	Infravermelho médio
NCTC	National Collection of Tissue Cultures
MTT	Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio
NIR	Infravermelho próximo
NMP	Número mais provável
Overlay	Camada extra de meio de cultura
PAS–FTIR	Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i>
PC	Polycarbonato
PET	Poli (tereftalato de etileno)
PLGA	Ácido poliglicólico
POM	Poli (oximetileno)
PP	Polipropileno
PPHMA	Poli (hidroximetilmetacrilato)
PMMA	Poli (metacrilato de metila)
PR	Resina fenólica, backelite®
PS	Poliestireno
PTFE	Poli (tetrafluoretileno)
PVC	Poli (cloreto de vinila)
RF	Potência de Rádio-Frequência
RIE	<i>Reactive Ion Etching</i>
RIE-O₂	Plasma com acoplamento capacitivo usando gás O ₂
RIE-O₂ + H₂O₂	Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O ₂ e H ₂ O ₂
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SFB	Soro fetal bovino
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tm	Temperatura de fusão cristalina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UHMWPE	Polietileno de ultra alto peso molecular

USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
Valor D	Parâmetro de resistência do microrganismo sensor do processo esterilizante
XPS	Espectroscopia eletrônica de raios X

LISTA DE SÍMBOLOS

(O)	Oxigênio atômico
μL	Microlitros
Ar	Argônio
CF₄	Tetrafluoreto de carbono
cm	Centímetro
cm⁻¹	Unidade por centímetro (unidade/cm)
CO₂	Dióxido de carbono
g	Gramas
h	Horas
H₂	Hidrogênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
He	Hélio
keV	Kilo elétron volt
kgf/cm²	Kilogramas força por centímetro quadrado
L	Litros
mg/L	Miligramas por litro
MHz	Mega hertz
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mTorr	Mili torricelli
N	Unidade de força Newton
N₂	Nitrogênio
N₂O	Óxido nitroso
O/C	Razão entre os elementos oxigênio e carbono
O°	Radical oxigênio
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Radical superóxido
°C	Grau célcus
HO°	Radical hidróxido
ppm	Partes por milhão

q.s.p.	Quantidade suficiente para
Ra	Rugosidade média
rpm	Rotações por minuto
Rt	Rugosidade pico a pico
s	Segundos
sccm	<i>Standard cubic centimeters per minute</i> (centímetro cúbico padrão por minuto)
SF₆	Hexafluoreto de enxofre
SO₂	Dióxido de enxofre
Torr	Torricelli
W	Watts

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 Esterilização de artigos termossensíveis – métodos tradicionais	05
2.1.1 Introdução	05
2.1.2 Gás óxido de etileno (EtO)	05
2.1.3 Irradiação gama	09
2.2 Plasma	10
2.2.1 Introdução	10
2.2.2 Influência de parâmetros operacionais	12
2.2.3 Eficácia esterilizante	14
2.2.4 Alterações poliméricas indesejáveis.....	17
2.2.5 Alterações poliméricas desejáveis (intencionais)	19
2.3 Polímeros	20
2.3.1 Introdução	20
2.3.2 Polímeros para aplicação na indústria de produtos médico-hospitalares e biomateriais	23
2.3.2.1 Poli (cloreto de vinila) – PVC	24
2.3.2.2 Polietileno de alta densidade (HDPE)	25
2.3.2.3 Polipropileno (PP)	26
2.3.2.4 Poliuretano (PUR)	27
2.3.2.5 Policarbonato (PC)	29
2.3.3 Regulamentação aplicável aos produtos médico-hospitalares	29
2.4 Métodos de caracterização e avaliação da biocompatibilidade de polímeros	31
2.4.1 Introdução	31
2.4.2 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)	32
2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	35
2.4.4 Perfilometria	36
2.4.5 Microanálise em sistema <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (EDS) .	38
2.4.6 Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método biológico de difusão em agar...	39

	Pág.
3 . OBJETIVOS	42
4 . MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Material	44
4.2 Métodos	45
4.2.1 Obtenção das suspensões de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372	46
4.2.1.1 Repiques de manutenção	46
4.2.1.2 Obtenção de esporos	46
4.2.1.3 Acompanhamento do grau de esporulação	47
4.2.1.4 Recolhimento e lavagem dos esporos	48
4.2.1.5 Tratamento térmico	48
4.2.2 Padronização das suspensões de esporos	49
4.2.3 Padronização da densidade da carga de esporos inoculada nos monitores biológicos	50
4.2.4 Validação do método de recuperação de esporos inoculados em solução utilizando filtração esterilizante	52
4.2.5 Preparação dos monitores biológicos e comprovação da estanqueidade	54
4.2.6 Inoculo dos monitores biológicos	56
4.2.7 Tentativa de validação do método de recuperação dos esporos inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos utilizando filtração esterilizante	58
4.2.8 Validação do método de recuperação dos esporos inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos utilizando método dos tubos múltiplos ou NMP (número mais provável)	59
4.2.9 Ciclos de exposição dos monitores biológicos ao plasma	61
4.2.10 Enumeração de esporos sobreviventes e acompanhamento da letalidade/resistência	68
4.2.11 Preparação das amostras de polímeros distintos	68
4.2.12 Ciclos de exposição das amostras dos polímeros ao plasma	69
4.2.13 Avaliação da compatibilidade das amostras dos polímeros com o processo esterilizante por plasma	70
4.2.13.1 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)	70
4.2.13.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	71
4.2.13.3 Perfilometria	74

	Pág.
4.2.13.4 Microanálise em sistema <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (EDS) .	76
4.2.13.5 Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método biológico de difusão em ágar	76
5. RESULTADOS	79
5.1 Obtenção dos monitores biológicos para processo esterilizante por plasma	79
5.2 Validação do método de recuperação dos esporos sobreviventes ao processo esterilizante por plasma	83
5.3 Eficácia do processo de esterilização por plasma	86
5.3.1 Recuperação de esporos sobreviventes	86
5.3.2 Curvas de letalidade microbiana	96
5.3.3 Valores D	105
5.4 Avaliação da compatibilidade das amostras dos polímeros com o processo de esterilização empregando plasma	106
5.4.1 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)	106
5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	113
5.4.3 Perfilometria	119
5.4.4 Microanálise em sistema <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (EDS)	121
5.4.5 Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método biológico de difusão em ágar ..	127
6. DISCUSSÃO	128
6.1 Efetividade esterilizante do plasma	128
6.2 Compatibilidade polimérica do plasma	152
6.2.1 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)	156
6.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) e perfilometria	165
6.2.3 Microanálise em sistema <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (EDS)	169
6.2.4 Citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método biológico de difusão em ágar	172
7. CONCLUSÕES	175
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
9. ANEXOS	196

1. INTRODUÇÃO

Os processos de esterilização têm como objetivo promover a completa eliminação ou destruição dos diferentes grupos de microrganismos presentes em um determinado material, sendo estes vírus, bactérias, fungos, os dois últimos em suas formas vegetativa e esporulada, compatibilizando com nível de segurança aceitável, tanto para o paciente quanto para o usuário ou o operador (PADOVEZE & DEL MONTE, 2003).

Os métodos esterilizantes podem ser divididos em físicos, químicos e físico-químicos. Os processos físicos são principalmente o de vapor saturado/autoclaves, calor seco/estufas, radiação/raios gama. Os métodos químicos envolvem banhos ou lavagens que utilizam glutaraldeído, formaldeído e ácido peracético (RUSSEL *et al.*, 1982; RUTALA, 1995, ALFA *et al.*, 1998). Os métodos físico-químicos (no geral considerados simplesmente químicos) envolvem principalmente processos onde se tem a ação dos dois fatores utilizados nos métodos anteriores, tal como o uso de esterilizador por óxido de etileno, vapor a baixa pressão e formaldeído (YOUNG, 1997).

O método de calor úmido, na forma de vapor saturado sob pressão, é o mais usado (RUTALA, 1996). Apresenta como vantagem a baixa toxicidade, o baixo custo, a ausência de resíduos, o elevado poder esporicida e a compatibilidade com a maior parte dos materiais empregados em unidades hospitalares. Os principais mecanismos da esterilização neste caso são a coagulação e desnaturação irreversível de proteínas e enzimas celulares, assim como a expansão adiabática das moléculas de água no interior dos organismos, promovendo a ruptura de sua membrana biológica durante a etapa de descompressão das câmaras de autoclave (RUTALA, 1996).

O uso de calor seco também é bastante empregado, mas difere dos processos em autoclave, não proporcionando a transmissão de calor latente nem o aumento da pressão. Assim, utiliza temperaturas mais altas, sendo mecanismo principal deste processo esterilizante a oxidação dos constituintes dos organismos vivos.

O principal fator limitante destes métodos consiste nas elevadas temperaturas que adotam, podendo, por exemplo, degradar os materiais poliméricos utilizados em catéteres e outros dispositivos de uso médico-hospitalar. As limitações abrangem materiais empregados em endoscopias, e grande diversidade de outros produtos médico-hospitalares de natureza polimérica, a serem utilizados em vasta gama de técnicas clínicas, terapêuticas e cirúrgicas (HOLY, 2001).

Os processos que operam sob temperaturas compatíveis com materiais termossensíveis, gás óxido de etileno e radiação ionizante, agregam desvantagens importantes envolvendo, respectivamente, aspectos de toxicidade ocupacional, ambiental e ao paciente (OLIVEIRA, 2000; PINTO *et al.*, 2002), bem como alterações intrínsecas aos mesmos (SHINTANI, 1995).

Características ideais para um processo de esterilização a baixa temperatura envolvem: alta eficácia, ação rápida, grande poder de penetração, compatibilidade com o maior número de materiais, não utilização ou geração de produtos tóxicos, eficiência mesmo em presença de material orgânico, facilidade de adaptação em qualquer ambiente (hospitalar ou industrial), possibilidade de ser monitorado e facilidade de operação (HOEFEL, 2002).

Processo inovador e potencialmente compatível com os itens anteriormente citados tem sido alvo de amplos estudos e denominado de plasma, o 4º estado da matéria, onde o agente letal agrega entidades altamente reativas provenientes de gás ionizado por aplicação de descarga elétrica e originalmente desprovido de atividade microbida.

Neste âmbito, destacam-se os chamados “Plasmas frios”, os quais podem ser gerados, por exemplo, aplicando-se potência de rádio-freqüência (RF) entre 1-100MHz e descargas elétricas de pulso como “Corona” ou “Descarga de Barreira Dielétrica” (DBD) com intensidade de energia constante em função do tempo (MOISAN *et al.*, 2001).

Entretanto, não foi ainda desenvolvido processo efetivo utilizando plasma como principal elemento esterilizante. Os equipamentos comercialmente disponíveis atuais utilizam a etapa de plasma para eliminar os resíduos tóxicos gerados pelos métodos de esterilização com peróxido de hidrogênio ou ácido peracético, já que a etapa de plasma só é efetuada no final do ciclo de esterilização (HAYAKAWA *et al.*, 1998, KREBS *et al.* 1998).

Assim como inexiste a disponibilidade do emprego de um processo específico utilizando plasma verdadeiro para a efetiva esterilização, também não foi desenvolvido qualquer equipamento comercial que permita utilizar este método de esterilização (MOISAN *et al.*, 2001).

Adicionalmente, sabe-se de limitações possíveis quanto aos aspectos de validação, seja no que tange a limitações dimensionais da câmara esterilizante, seja na configuração do produto (ANDERSON, 1989; LEROUGE *et al.*, 2001; LEROUGE *et al.*, 2002). Encontram-se como causas destas preocupações a distribuição homogênea de plasma formado, assim como a meia vida de suas entidades sabidamente instáveis (MOREAU *et al.*, 2000), aspectos estes desvantajosos tendo em vista a eficácia do plasma frente a materiais já embalados, apresentando resíduos orgânicos aderidos e, principalmente, geometricamente complexos e de difícil acesso ao agente esterilizante.

Dados acerca da letalidade de microrganismos presentes no interior de longos e estreitos *lumens* ainda são insuficientes e contraditórios (RUTALA *et al.*, 1998; RUTALA *et al.*, 1999; ALFA *et al.*, 1996; PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000; BÄR *et al.*, 2001; HURY *et al.*, 1998; SOLOSHENKO *et al.*, 2000), principalmente quando da utilização de plasmas verdadeiros. Em situação similar encontram-se as informações relativas a possíveis alterações intrínsecas, onde ainda não há consenso sobre a aplicabilidade benéfica do plasma abrangendo os diversos polímeros utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares (LEROUGE *et al.*, 2002; GOLDMAN & PRUITT, 1998; GOGOLEWSKI *et al.*, 1996).

Há ainda que se considerar a diversidade de parâmetros que podem ser adotados na validação e posterior execução rotineira de ciclos esterilizantes por plasma que sejam seguros, eficazes e aplicáveis. Tais variáveis têm sido intensamente estudadas por diversos pesquisadores na tentativa de se padronizar condições de processo, possibilitando sua efetiva validação (MOISAN *et al.*, 2001).

Torna-se fundamental, portanto, cuidadoso e amplo estudo destas questões sob condições padronizadas, de forma a viabilizar o amplo emprego da esterilização por plasma em produtos médico-hospitalares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esterilização de artigos termossensíveis – métodos tradicionais

2.1.1 Introdução

Recentes avanços nas ciências médicas têm contribuído significativamente para que novas tecnologias de materiais e processos tecnológicos sejam alvo de estudos pautados no conhecimento científico, ganhando financiamento e projeção em nível mundial.

No âmbito da esterilização de materiais termossensíveis, verificou-se grande impasse nas últimas décadas, o que impulsionou a busca por alternativas aplicáveis. Apesar das limitações da irradiação (seja cobalto 60 ou elétron acelerado), a situação apresentava-se estável. Ainda, Europa e Estados Unidos divergiam quanto à esterilização, a primeira deslocando-se para formaldeído líquido e/ou glutaraldeído (RUSSEL, 1982) e vapor a baixa pressão de peróxido de hidrogênio, enquanto que os segundos com elevadíssima tendência para óxido de etileno.

Aspectos ocupacionais e ambientais provocaram, entretanto, grandes mudanças (RUTALA *et al.*, 1996; DEN ELZEN *et al.*, 1992). Os controles tornaram-se mais rígidos, e o atendimento a questões legais, com regulamentações severas (BRASIL, 1999; PINTO *et al.*, 2002; PINTO, 2003) direcionou a pesquisas de substâncias e processos alternativos.

2.1.2 Gás óxido de etileno (EtO)

O grande mérito do uso do óxido de etileno decorre de sua aplicação abrangente, inclusive com relação a materiais incompatíveis com radiação esterilizante (BURGESS, 1993; RUSSEL, 1996). Aliado às características de elevada difusibilidade e volatilidade, que respondem pela eficácia e segurança biológica do processo esterilizante por óxido de etileno, a facilidade com que sempre se contornou suas características negativas (flamabilidade, com a adoção de misturas inertes; toxicidade, com o emprego de equipamentos de

proteção individual e coletiva - EPIs e EPCs) tornou este o processo de maior opção, particularmente dentre os fabricantes de produtos médico-hospitalares (OLIVEIRA, 2000; PINTO *et al.*, 2002; OLIVEIRA & PINTO, 2002).

Para metodologias envolvendo óxido de etileno (EtO), os processos utilizaram inicialmente o gás na sua forma pura, sem misturas. Variações deste método utilizavam o EtO diluído em clorofluorcarbonos (CFCs), principalmente para reduzir a inflamabilidade e explosividade inerentes a ele, diminuindo, portanto, os riscos na sua aplicação (PINTO, 1991; PINTO *et al.*, 2002; OLIVEIRA & PINTO, 2002). Tal prática teve de ser modificada em decorrência do efeito deletério dos CFCs à camada de ozônio. Pesquisas recentes envolvendo misturas com hidroclorofluorcarbonos (HCFCs), muito menos agressivos à camada de ozônio quando comparados aos CFCs, evidenciaram que os HCFCs são alternativas muito promissoras quando se trata da preocupação ambiental envolvendo tais questões (OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA & PINTO, 2001; OLIVEIRA & PINTO, 2002).

Com relação às misturas esterilizantes, permanece ainda maior uso para aquela que utiliza proporção de 12% de óxido de etileno e 88% de CFC 12 (clorofluorcarbono 12), sob denominação comercial de Oxyfume 12[®] (PINTO, 1991; OLIVEIRA, 2000; PINTO & OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA & PINTO, 2002), de custo bastante acessível se comparada à mistura que utiliza HCFCs 22 e 124, denominada comercialmente de Oxyfume 2002[®] (OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA & PINTO, 2001; OLIVEIRA & PINTO, 2002). Entretanto, Resolução n° 267, de 14 de setembro de 2000, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), preconiza a retirada total de CFCs do mercado Brasileiro até 2007, sendo que sua importação iniciou supressão gradativa em 2001 (15%) e deverá atingir 100% de totalidade em 2007. As importações envolvendo os HCFCs continuarão permitidas, porém sofrendo controle por parte do governo Brasileiro através da referida resolução, e exigindo cadastramento da empresa importadora e comercializadora no Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) e dos Recursos Naturais Renováveis (BRASIL, 2000).

Consenso internacional sobre a diminuição drástica do consumo mundial de CFCs resultou, em 1987, no chamado “Acordo de Montreal sobre Substâncias que agridem a Camada de Ozônio”, tendo sido assinado por 24 nações e estabelecendo reduções drásticas de consumo (MANZER, 1990). Embora as misturas que utilizam CFCs respondam por cerca de 2 a 5% de todo o CFC utilizado domesticamente, foram incluídas no termo deste acordo. O Programa Brasileiro de eliminação da produção e do consumo das substâncias que destroem a camada de ozônio (PBCO), através da Resolução nº 267, do CONAMA, formalizou compromisso do Governo Brasileiro junto à Secretaria do Protocolo de Montreal em junho de 1994, estabelecendo a eliminação gradativa do uso destas substâncias no país (BRASIL, 2000).

O uso de EtO continua sendo bastante intenso, porém outro aspecto negativo e que vem sendo objeto de muitos estudos diz respeito às propriedades carcinogênicas apresentadas pelos materiais esterilizados por este método, afetando a segurança de pacientes e operadores (OLIVEIRA, 2000). Estas propriedades estão diretamente relacionadas a resíduos do gás, bem como seus subprodutos etilenocloridina e etilenoglicol potencialmente presentes no material processado. Assim, prosseguem as pesquisas relacionadas a aspectos de aeração de itens processados e concomitante redução dos níveis residuais, na tentativa de minimizar riscos potenciais (STEELMAN, 1992).

Outra preocupação inerente ao uso de óxido etileno reside em aspectos ocupacionais, razão pela qual a *Ocupacional Safety and Health Administration* (OSHA) estabeleceu limite de 1ppm (parte por milhão) para jornada de trabalho de 8h, sendo que em 1988 foi acrescentado limite para exposição a curto-prazo de 5ppm (SARTO, 1991 e SZOPINSKI, 1991). Assim, o treinamento de pessoal envolvido quanto a execução correta de procedimentos de operação e uso de equipamentos de segurança são fatores primordiais para redução de riscos de exposição desnecessários.

Também no reprocessamento de produtos médico-hospitalares, aspecto que se constitui em grande preocupação nos hospitais, o óxido de etileno tem sido o esterilizante de escolha. Entretanto, a freqüente inexistência de instalações adequadas, seja no próprio hospital ou em empresas que oferecem

serviços de terceirização, tem acarretado a busca de alternativas (RUTALA, 1996). Estudos recentes abordando tais aspectos de reprocessamento evidenciaram grande preocupação com relação à reutilização desses materiais, uma vez que os dados obtidos mostraram presença de esporos bacterianos e endotoxinas após alguns ciclos de reprocessamento laboratoriais. Ainda, ocorrência de falhas na integridade física dos materiais avaliados, bem como presença de resíduos de material estranho em algumas unidades levou a conclusão de que a reutilização desses materiais fabricados para uso único não deve ser permitida ou praticada ilegalmente, pois tal conduta acarreta em comprometimento da segurança do paciente (SILVA, 2002).

Recentes desafios envolvendo o processo esterilizante por óxido de etileno têm sido concentrados em áreas abrangendo aspectos de monitoração direta de parâmetros críticos durante o processo, utilizando sensores de concentração gasosa e umidade relativa posicionados no interior das câmaras. Questões pautadas em aspectos de engenharia na construção dos sensores (precisão, exatidão, sensibilidade, especificidade), bem como fatores interferentes na sua *performance* (condensação de vapor saturado de água e etilenoglicol em componentes ópticos, ambiente oxidante) têm sido alvo de crescentes estudos (SMITH, 2001).

O avanço do uso de alta tecnologia na monitoração dos parâmetros críticos durante o processo tem sido de substancial importância no âmbito da liberação paramétrica de produtos processados, a despeito da liberação convencional atualmente empregada. Liberação paramétrica de itens esterilizados por óxido de etileno consiste em declarar o produto estéril com base em parâmetros físicos e químicos obtidos em tempo real, enquanto que a liberação convencional é baseada em dados relativos à letalidade de indicadores biológicos submetidos ao processo e posteriormente incubados, bem como teste de esterilidade, requerendo tempo de espera pós-processo para liberação dos produtos. Sob o ponto de vista científico, a validação e o estabelecimento desta nova tecnologia contribui sobremaneira para possibilitar a adoção desta prática com inúmeras vantagens e provendo incremento na qualidade do controle de processo (SORDELINI *et al.*, 2001). Ainda nesta direção, modelos matemáticos têm sido desenvolvidos, os quais, aliados as

novas tecnologias de monitoração direta de parâmetros, têm papel fundamental no direcionamento da liberação paramétrica, sua validação e adoção por parte de empresas produtoras e processadoras de produtos médico-hospitalares termossensíveis, sem comprometimento da segurança dos pacientes e usuários. Tais modelos são baseados em similares utilizados com sucesso em processos esterilizantes por vapor de água saturado sob pressão, e envolvem cálculo do número de sobreviventes pós-ciclo e determinação da letalidade acumulada pós exposição ao gás óxido de etileno (MOSLEY *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

2.1.3 Irradiação gama

A tecnologia empregada em esterilizações sob baixa temperatura envolvendo radiação gama apresenta alto custo tanto pelo material utilizado, quanto pelos recursos de segurança necessários. Adicionalmente, as grandes intensidades de energia necessárias para a esterilização podem afetar as propriedades de materiais de natureza polimérica, promovendo modificações estruturais que incluem degradação das cadeias poliméricas, formação de radicais livres, ligações cruzadas e duplas ligações, resultando em alterações mecânicas e visuais, bem como reduzindo a vida útil dos mesmos e comprometendo sua funcionalidade (SHINTANI, 1995).

Estudo de Pruitt e Ranganathan (1995) envolvendo esterilização de enxertos tibiais por radiação gama ^{60}Co revelaram seus efeitos na estrutura e resistência à fadiga/fratura do polímero. O material, constituído de polietileno de altíssimo peso molecular, apresentou alterações morfológicas e estruturais como tortuosidade da configuração lamelar, aumento da cristalinidade devido ao rompimento de cadeias, oxidação e diminuição da resistência à fadiga e fratura.

Oxidação de polímeros após esterilização por radiação gama tem sido reportada como responsável por degradação oxidativa, levando-os a se tornarem quebradiços e comprometendo as aplicações ortopédicas de implantes confeccionados com polietileno de altíssimo peso molecular. Estudo

de Goldman e colaboradores (1997) utilizando o mesmo polímero, o qual foi submetido a uma dose de radiação gama de 25kGy, mostrou altíssimo grau de oxidação, evidenciado através da detecção de picos carbonila por análise química em espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR), recurso também utilizado em estudos semelhantes por outros autores (COLLIER *et al.*, 1996; SHEN *et al.*, 1999).

2.2 Plasma

2.2.1 Introdução

Uma das grandes possibilidades na área de esterilização, a mais revolucionária, consiste no emprego do plasma como processo esterilizante (LUNDHOLM & NYSTROM, 1994; JACOBS, 1994). Embora já se tenha nos últimos anos divulgado, e inclusive comercializado, equipamentos atrelados ao emprego do plasma, com ênfase para o Plazlyte® (Abtox) (BRYCE *et al.*, 1997) e Sterrad® (J8J) (HERMELIN, 1998), há controvérsias a serem esclarecidas.

No âmbito da tecnologia, há que se estudar o efeito da composição do gás na letalidade dos esporos (LEROUGE *et al.*, 2000c), já que nos equipamentos comercialmente disponíveis o plasma é mero agente complementar de detoxicação do agente ativo principal, seja ele o peróxido de hidrogênio ou o ácido peracético (KREBS *et al.*, 1998; KUCHMA *et al.*, 1996). Estes sistemas, embora eficientes, não são considerados verdadeiros processos esterilizantes por plasma.

O uso de técnicas de esterilização por plasma como único agente esterilizante oferece grandes vantagens em relação a outras já utilizadas, pois podem se mostrar efetivas quanto à redução da carga microbiana, além de se desenvolverem em temperaturas próximas à temperatura ambiente e não utilizarem gases tóxicos. Consistem em expor os materiais contendo microrganismos a espécies reativas geradas pela ionização de um gás, geralmente desprovido de efeito biocida inerente (normalmente oxigênio),

utilizando-se para isso campos eletromagnéticos (MOISAN, 2001; OHSHIMA *et al.*, 1997; HERMELIN *et al.*, 1998; RUTALA *et al.*, 1999).

Com ênfase, plasmas verdadeiros são formados ao submeter-se um gás a um campo elétrico, constante ou de frequência alternada. O campo elétrico acelera as partículas carregadas, os elétrons, uma vez que os íons são muito mais pesados, sendo que a energia é transferida ao plasma através das colisões entre os íons e os elétrons. Entidades altamente reativas são formadas, sendo estas responsáveis diretamente pelo efeito biocida, ou seja, ataque e reação com os sítios nucleofílicos dos microrganismos presentes no processo, seja em nível de membrana celular ou diretamente ao material genético dos mesmos, promovendo sua inativação (MOISAN *et al.*, 2001b).

Ademais, há a necessidade de se esclarecer a atuação apenas das entidades reativas geradas após ativação elétrica de gases desprovidos de efeitos microbicidas, os plasmas verdadeiros, sem exposição prévia do material a gases com efeito antimicrobiano, como o peróxido de hidrogênio em equipamentos já disponíveis no mercado (Sterrad®).

Esforços têm sido feitos no sentido de viabilizar o emprego dos chamados “plasmas frios”, os quais potencialmente podem ser usados para fins esterilizantes. Os “plasmas frios” são caracterizados por temperatura gasosa próxima à temperatura ambiente, onde itens submetidos à exposição direta ao plasma não sofrem efeitos de alta temperatura, compatibilizando com materiais termolábeis. Esse tipo de plasma pode ser obtido usando descargas elétricas de pulso como corona ou descarga de barreira dielétrica (DBD) (ELIASSON & KOGELSCHATZ, 1991), intensidade de energia constante em função do tempo, radio-frequência entre 1-100MHz e descargas de microondas maiores que 300MHz sob baixa corrente (LEROUGE *et al.*, 2000c).

Resultados de natureza diferenciada e muitas vezes contraditória evidenciam que o sucesso da esterilização por plasma, quer seja no aspecto de efetividade ou na manutenção das propriedades intrínsecas, estão intimamente atrelados a condições de processo (gás, temperatura, pressão, tempo de exposição, umidade relativa, voltagem), bem como particularidades relativas aos materiais processados, as quais têm se revelado as mais diversas

possíveis, dificultando inclusive comparações diretas e permitindo somente tecer paralelos entre resultados.

Muito ainda se tem a esclarecer, objetivando a padronização de condições e a busca por um processo aplicável sob todos os aspectos, abrangendo maior gama de itens possível. Entretanto, é preciso levar em consideração que a existência de ampla gama de sistemas que utilizam a tecnologia de plasmas verdadeiros, bem como a diversidade e particularidades de aspectos relacionados à engenharia e construção de equipamentos freqüentemente dificultam a padronização dessas condições, e portanto, sua validação.

Assim, é fundamental direcionar esforços para a obtenção de conhecimento amplo dos mecanismos de geração do plasma e suas possíveis aplicações (GADRI *et al.*, 2000). Apenas desta forma, o desafio em se identificar o agente esterilizante ideal, de alta eficácia, atividade rápida, penetrabilidade, compatibilidade, atoxicidade e que seja custo-efetivo (RUTALA *et al.*, 1996) poderá vir a ser de fato bem sucedido, com respostas acima de tudo pautadas no conhecimento científico.

2.2.2 Influência de parâmetros operacionais

O estudo das diversas variáveis aplicadas ao processo de esterilização por gás plasma tem merecido atenção por parte de diversos pesquisadores. Diferentes tipos de gases (HURY *et al.*, 1998; KELLY-WINTENBERG, 1998), pressões e voltagens de descarga elétrica distintas (KHOMICH *et al.*, 1997; LISOVSKIY *et al.*, 2000), temperaturas diversas (MOREAU *et al.*, 2000), bem como influência da radiação UV no processo de esterilização (LEROUGE *et al.*, 2000b; MOREAU *et al.*, 2000; BOUCHER (GUT), 1985) têm sido intensivamente investigados.

O gás ou mistura de gases envolvidos na esterilização por plasma não tem efeito biocida, necessitando de ativação por descarga elétrica para gerar entidades altamente reativas. Boucher (1985) observou ainda que alguns

gases (ex: CO₂) são mais eficientes em relação a outros (ex: Ar) na inativação de esporos bacterianos. D'Agostino e colaboradores (1990) constatou eficiência na esterilização por plasma empregando gases distintos submetidos à descarga elétrica, como O₂, N₂, Ar, halogênios, N₂O, H₂O, H₂O₂, CO₂, SO₂, SF₆, aldeídos, ácidos orgânicos, etc, independentemente do tipo de descarga.

A influência do tipo de microrganismo tem sido foco de muitos estudos envolvendo aspectos de letalidade frente ao processo de esterilização por plasma. Boucher (1985) demonstrou maior resistência do *Bacillus stearothermophilus* em relação ao *Bacillus subtilis* usando plasma de ar ambiente à pressão média de 0,6 a 1,1Torr, conclusão esta confirmada por Kelly-Winterberg (1998) à pressão atmosférica. Em contraste, Hurry trabalhando com plasma de O₂ a baixa pressão, encontrou maior resistência para *Bacillus subtilis* (HURRY *et al.*, 1998). Seguindo esta linha, Moisan e colaboradores consideram seguro que um sistema esterilizante por gás plasma deva usar *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e uma bactéria Gram negativa como indicadores biológicos (MOISAN *et al.*, 2001).

Addy (1991) apresenta premissas associadas ao gás precursor, ao efeito da temperatura e embalagem. Suportes contendo ou não adição de soro e de sais são possíveis fatores de influência (ALFA, *et al.*, 1996). A importância da umidade fica entre questões operacionais e de eficácia (PENNA *et al.*, 1999).

Aspectos de influência começam a merecer maior atenção à medida que os mecanismos de ação (CHAU *et al.*, 1996; MOISAN *et al.*, 2001) são entendidos. Tornando o desafio mais interessante, somam-se aspectos de destruição direta por radiação UV do material genético, erosão de átomos por fotodessorção intrínseca decorrente da radiação UV, e por fim, erosão direta dos microrganismos, átomo a átomo, através de ataques por radicais emanados do plasma (MOISAN *et al.*, 2001). Este último mecanismo, exacerbado pela radiação UV, possibilita visualizar solução para esterilizar os *prions*, um dos desafios atuais, sendo que o tempo total para sua inativação seria superior aos preconizados para inativar microrganismos, pois seria requerido altíssimo grau de erosão direta.

Os equipamentos que utilizam fonte de RF para a geração da potência para quebra do gás, constituída de corrente contínua (DC) diferem daqueles que empregam microondas para a geração da energia quanto à intensidade e a possibilidade de maior fornecimento de entidades reativas ao processo (LEROUGE *et al.*, 2001; MOISAN *et al.*, 2002)

Outra possibilidade se constitui na modificação da configuração da câmara de esterilização. Em trabalho realizado por Moisan e colaboradores empregando câmaras em forma de tubo, sistemas *Inductively Coupled Plasma* (ICP), foi estudada a influência da distância entre a localização das amostras e a fonte geradora de plasma. À medida em que as amostras se distanciavam do plasma, a resistência das cepas microbianas aumentava, influenciada pela curta meia vida das espécies reativas (MOISAN *et al.*, 2002).

A emissão de fótons ultravioleta (UV) por elétrons excitados, ao decaírem para um nível menor de energia depois de ganharem energia suficiente para subirem a um nível mais energético, tem papel sinérgico na esterilização, uma vez que podem promover danos parciais na camada externa da parede das células microbianas rica em pontes dissulfeto, facilitando assim o ataque das entidades reativas e sua entrada na região intracelular (BOUCHER (GUT), 1985).

2.2.3 Eficácia esterilizante

No que tange à avaliação da eficácia do processo utilizando como biosensores esporos depositados nos locais de difícil acesso em produtos médico-hospitalares, configurando barreira adicional ao plasma, trabalho de Rutala e colaboradores (1998) evidenciou valores insatisfatórios quando da utilização de inóculo de carga de 10^6 esporos de *Bacillus stearothermophilus* em *lumens* de segmentos em posição central de corpos de prova tubulares. Estes segmentos eram intercambiáveis, permitindo o emprego de diferentes dimensões (1mm, 2mm e 3mm) e acoplados a tubos de aço inoxidável de 40cm de comprimento. Foi evidenciada falha na esterilização por peróxido de

hidrogênio em ciclo padrão (Sterrad 100S®) em algumas amostras, avaliadas por teste de esterilidade, onde a letalidade microbiana foi menor quanto menor o diâmetro testado: os corpos de prova de 1mm apresentaram 74% de falha no quesito esterilidade, enquanto que os de 2mm apresentaram 6% e os de 3mm apresentaram 4%. Contrariamente, estudos posteriores dos mesmos autores (RUTALA *et al.*, 1999) apresentaram resultado satisfatório do processo atrelado ao plasma quanto à letalidade de esporos de *B. stearothermophilus* em *lumens* tubulares de 1mm, 2mm e 3mm de diâmetro interno utilizando Sterrad 50®.

Na tentativa de se alcançar maiores esclarecimentos quanto à letalidade de microrganismos presentes em locais de difícil acesso ao agente esterilizante, outros estudos têm sido desenvolvidos, entretanto, poucos dados satisfatórios encontram-se disponíveis e muito se tem a esclarecer sobre este aspecto. Características de configuração de produtos médico-hospitalares, promovendo dificuldade de acesso do agente esterilizante, bem como complexidade de peças acopladas, eletrônicas ou não, podem resultar em ineficácia no processamento desses itens, bem como dano funcional irreversível.

Alfa e colaboradores (1996), em estudo amplo e comparando a eficácia esterilizante do óxido de etileno (12:88) e plasma, em tubos de plástico de 125cm e 3,2mm de diâmetro interno, trabalhando com diferentes cepas microbianas, constataram falha na eficácia do processo por plasma de peróxido de hidrogênio.

Fatores envolvendo procedimentos de limpeza e secagem adequadas de produtos médico-hospitalares tubulares de longa extensão e diâmetro interno reduzido, assim como presença de material aderido e umidade residual, influenciaram negativamente a letalidade microbiana em produtos como catéteres angiográficos, agulhas de anestesia epidural e bainhas introdutoras (PENNA *et al.*, 1999).

Em estudo posterior, tendo em vista a intenção de prover maiores esclarecimentos quanto a esta problemática, Penna e Ferraz (2000) avaliaram eficácia do processo por plasma de peróxido de hidrogênio (Sterrad 100®) no

reprocessamento em nível hospitalar de catéteres angiográficos (100cm x 1mm) e agulhas de anestesia epidural em aço inoxidável (100mm x 0,6mm), inoculados internamente com alta carga de esporos resistentes e após, tratados com detergente enzimático e solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% previamente aos ciclos esterilizantes. O processo mostrou-se eficaz e não foram encontrados sobreviventes após todas as condições de ciclo. Entretanto, foi evidenciado que é de fundamental importância execução de pré-tratamento adequado desses materiais preliminarmente à sua esterilização. Ainda, o estudo não esclarece quanto à efetividade esterilizante do processo na ausência de pré-tratamento.

Considerações de natureza contrária foram obtidas por Bär e colaboradores (2001), utilizando inóculo do microrganismo patogênico *Mycobacterium tuberculosis* (na forma vegetativa) em broncoscópios, onde os resultados evidenciaram falha do processo de esterilização por plasma, mesmo após intensa lavagem do material em estudo com solução de glutaraldeído previamente ao processo esterilizante.

Numa outra abordagem, questionamento importante se faz com relação ao número de células a serem depositadas nas superfícies de desafio, bem como a disposição das mesmas, afetando a letalidade microbiana, sejam estas superfícies expostas (suportes vítreos, celulósicos ou aço inoxidável) ou internas (tubos de calibre reduzido confeccionados em materiais poliméricos ou aço inoxidável).

Nesse sentido, resultado interessante foi obtido por Hury e colaboradores (1998), onde esporos resistentes de distintas cepas do gênero *Bacillus* foram depositados no interior de *lumens* de tubos de aço inoxidável sob duas condições diferentes: 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) contidas em 50 μ L e 10^7 UFC contidas em 500 μ L de água deionizada, esta última alíquota portanto possuindo menor densidade celular superficial. Foram obtidas duas curvas de cinética microbiana com dois comportamentos de letalidade diferentes e também duas inclinações distintas, tendo sido a letalidade maior para o inóculo de menor densidade celular, sugerindo que

menor formação de agregados resulta em maior número de esporos expostos diretamente ao plasma e portanto, maior taxa de destruição microbiana.

Seguindo caminho semelhante, Soloshenko e colaboradores testaram inóculo de esporos de *Bacillus subtilis* em superfícies expostas (placas de Petri de vidro) com densidades celulares variando entre 10^4 e 10^7 esporos/cm². Os resultados mostraram claramente que, também em superfícies expostas, o comportamento padrão de letalidade foi muito similar, ou seja, menor letalidade microbiana com relação ao inóculo de maior densidade celular (10^7 esporos/cm²) devido ao provável efeito protetor da sobreposição celular, dificultando o acesso das entidades reativas a todas as camadas (SOLOSHENKO *et al.*, 2000).

A vasta gama de resultados conflitantes e outras dificuldades muito provavelmente poderiam ser resolvidas com padronização de condições do processo e sua validação (WERNER, 1995).

2.2.4 Alterações poliméricas indesejáveis

Questões envolvendo alterações poliméricas intrínsecas, conformacionais e mecânicas têm merecido grande atenção, visto que direta ou indiretamente podem comprometer o uso de produtos médico-hospitalares. Portanto, é fundamental que se conheça a compatibilidade entre o processo por plasma e polímeros de diversas naturezas, pesquisando quaisquer modificações que limitem a utilização destes itens após sua esterilização.

Processos comercialmente disponíveis, como plasma de ácido peracético (PlazlyteTM) e peróxido de hidrogênio (Sterrad®) são apresentados pelos fabricantes como compatíveis com ampla gama de materiais. Faltam, entretanto, estudos mais consistentes.

Sabe-se do emprego do plasma como promotor de modificação superficial em materiais, particularmente aqueles de natureza polimérica. O plasma é conhecido por sua habilidade em modificar superfícies sólidas via mecanismo de bombardeamento, erosão e reações de deposição de partículas, bem como modificação de superfícies objetivando outras aplicações distintas

da finalidade esterilizante, como, por exemplo, aplicações industriais envolvendo polímeros semicondutores (LEROUGE *et al.*, 2002). Além disso, os próprios agentes químicos (ácido peracético e peróxido de hidrogênio) são conhecidamente potentes oxidantes. É da maior importância, portanto, atentar quanto à possibilidade de alterações em materiais diversos como efeito indireto do processo esterilizante empregando plasma.

Peças ortopédicas constituídas de polietileno de altíssima densidade foram submetidas aos efeitos da radiação ionizante e plasma de peróxido de hidrogênio (Sterrad®), comparativamente, tendo sido então avaliados danos superficiais (nível de oxidação), bem como alterações nas propriedades mecânicas do material. Foram encontrados níveis de oxidação comparados às amostras controle para o tratamento com plasma, sendo que as propriedades mecânicas foram afetadas de forma insignificante quando comparadas ao tratamento com radiação ionizante, o que levou à conclusão de promissora compatibilidade do processo por plasma com este tipo de polímero em particular (GOLDMAN & PRUITT, 1998).

Materiais médicos de fixação interna (pinos) constituídos de polímeros prolactídeos foram submetidos a processos empregando plasma de naturezas distintas (Ar, N₂, O₂, CO₂), onde foram avaliadas características de esterilidade, propriedades mecânicas e estabilidade molecular. Sob as condições testadas, foram obtidos resultados insatisfatórios com relação à esterilidade das amostras, não tendo sido observada interferência significativa com relação às propriedades mecânicas, peso molecular, polidispersão, cristalinidade e temperatura de fusão. Entretanto, a microscopia eletrônica de varredura evidenciou formação de rachaduras semelhantes a “teias de aranha” quando o plasma atingiu partículas aderidas ao material, tendo também a superfície se tornado mais lisa comparativamente às peças controle (GOGOLEWSKI *et al.*, 1996).

Tendo em vista a intenção de abranger modificações em gama maior de polímeros (biomateriais), estudo recente de Lerouge e colaboradores (2002) submeteram tubos e filmes de poli (cloreto de vinila) - PVC, catéteres de poliuretano (PUR) e tubos de polietileno de baixa densidade (LDPE) a

sucessivos ciclos esterilizantes abrangendo dois processos comercialmente disponíveis, Plazlyte™ e Sterrad®, e sob condições pré-definidas pelos fabricantes. Substanciais modificações em todos os polímeros estudados foram observadas, tendo sido a intensidade das alterações proporcional ao número de ciclos processados. Espectroscopia eletrônica de raios X (XPS), medida de ângulo de contato (DCA) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) apontaram, respectivamente, oxidação de superfície, mudanças na característica de molhabilidade e drásticas alterações superficiais em todos os polímeros, sendo esta última mais intensa com relação ao PVC.

Ainda, questão importante se refere ao comportamento diferente apresentado por polímeros idênticos possuindo forma distinta (exemplos: tubos e filmes de PVC) quando submetidos a processos esterilizantes por plasma. Os resultados evidenciaram a importância de se considerar as diferenças relativas ao processo de produção, concentração e natureza dos aditivos usados na formulação do polímero, bem como outras variáveis que certamente terão algum grau de influência sobre as características intrínsecas das peças mencionadas acima. Estas questões apontam também para o fato de que a composição genérica de um determinado polímero é insuficiente no julgamento sobre a segurança de esterilidade para itens de conformação distinta (LEROUGE *et al.*, 2002).

2.2.5 Alterações poliméricas desejáveis (intencionais)

A modificação das propriedades dos polímeros comerciais têm sido de grande importância sob o ponto de vista prático. O tratamento de polímeros por plasma utilizando ampla gama de gases e parâmetros de processo podem levar a mudanças envolvendo algumas características como molhabilidade, adesividade, adsorção, reatividade química, sensibilidade à luz, e principalmente, biocompatibilidade (STROBEL *et al.*, 1995; KACZMAREK *et al.*, 2002; TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; SVORCIK *et al.*, 2006; AOUTINI, 2003). A intenção têm sido,

principalmente, a criação de novas funcionalidades químicas e o aumento de características já existentes.

Salienta-se a utilização deste método em vários campos da tecnologia como litografia de alta resolução, fotopolimerização (deposição de camadas superficiais para fins protetores) e remoção à seco de compostos orgânicos aderidos a superfícies (KACZMAREK *et al.*, 2002).

2.3 Polímeros

2.3.1 Introdução

Moléculas contendo número de átomos em cadeia superior a uma centena e podendo atingir valores altos e limitados, ganhando, portanto, características próprias, são chamadas macromoléculas. Essas características são muito mais dominantes do que aquelas que resultam da natureza química dos átomos ou grupamentos funcionais presentes, sendo que as propriedades decorrem de interações envolvendo segmentos intramoleculares ou intermoleculares (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

Os polímeros representam uma das grandes contribuições da química para o desenvolvimento industrial do século XX. Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares, possuindo unidades químicas ligadas por covalência e repetidas regularmente ao longo da cadeia denominadas “meros”. O número de meros de uma cadeia polimérica é denominado grau de polimerização (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

Na grande maioria dos polímeros industrializados, o peso molecular se encontra entre 10^4 e 10^6 , sendo que muitos são considerados materiais de engenharia. Em alguns produtos de origem natural, o peso molecular pode atingir valores muito altos, cerca de 10^8 ou mais. Todos os polímeros mostram longos segmentos moleculares, de dimensões entre 100 e 100.000Å, os quais propiciam enlaçamentos e emaranhamentos, alterando o espaço vazio entre as cadeias denominado de volume livre. Com a elevação da temperatura,

aumentam os movimentos desses segmentos, tornando o material mais flexível (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

Os monômeros são micromoléculas ou subunidades dos polímeros, sendo compostos químicos susceptíveis a reagir para formar polímeros. A composição centesimal do polímero pode ser similar à dos monômeros, ou diferente, na dependência do tipo de reação que promoveu a interligação dos meros para formar a cadeia polimérica, reação esta denominada de polimerização (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

As propriedades especiais de moléculas muito grandes começam a surgir a partir de peso molecular da ordem de 1.000 a 1.500, e vão se tornando mais evidentes à medida que aumenta o peso molecular, podendo atingir até mesmo a ordem de milhões. A maioria dos polímeros de aplicação industrial tem pesos moleculares da ordem de dezenas ou centenas de milhar (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

As cadeias dos polímeros podem apresentar-se sem ramificações, admitindo conformação em zigue-zague, sendo denominados polímeros lineares, ou podem apresentar ramificações, sendo denominados polímeros ramificados (com diversos níveis de complexidade); podem ainda exibir cadeias com ligações cruzadas formando polímeros reticulados. Como consequência imediata, surgem propriedades diferenciadas decorrentes de cada tipo de cadeia, especialmente com relação à fusibilidade e solubilidade. A formação de ligações cruzadas “amarra” as cadeias, impedindo seu deslizamento umas sobre as outras, aumentando muito a resistência mecânica e tornando o polímero insolúvel e infusível (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

A nomenclatura dos polímeros pode ser feita de diversas maneiras e baseada em diferentes critérios, como por exemplo, a origem, número de monômeros envolvidos, método de preparação, estrutura química da cadeia, tipo de encadeamento, configuração dos átomos, taticidade da cadeia, fusibilidade e/ou solubilidade e, de acordo com o comportamento mecânico, podem ser divididos em borrachas, plásticos e fibras (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

Destaca-se também a importância das características moleculares do monômero para que seja possível uma fundamentada expectativa quanto às

propriedades e desempenho do material polimérico dele resultante, sendo portanto, necessário o conhecimento da estrutura química dos monômeros, o processo de preparação do polímero e a técnica escolhida para essa preparação. As propriedades serão então determinadas pela composição química, constituição, configuração e conformação das moléculas do polímero (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

Ainda, os polímeros podem existir no estado amorfo ou cristalino, sendo que a grande maioria se apresenta parcialmente nos dois estados. No primeiro caso ocorre uma disposição desordenada das moléculas, e no segundo caso há uma ordenação tridimensional, ou seja, existe cristalinidade. Na preparação dos polímeros, quando sua massa quente e viscosa é deixada resfriar sem interferências de forças externas, há primeiro a formação de cristalitos, em maior ou menor grau, dependendo da estrutura do polímero. Invertendo-se o processo, ao elevar-se progressivamente a temperatura da massa polimérica resfriada, passa-se primeiro por uma transição de pseudo-segunda ordem, chamada de temperatura de transição vítrea (T_g), a partir da qual as regiões amorfas readquirem progressivamente sua mobilidade. Prosseguindo-se o aquecimento, passa-se para uma transição de primeira ordem denominada temperatura de fusão cristalina (T_m), acima da qual o polímero estará no estado viscoso e adequado para a moldagem de artefatos (MANO & MENDES, 1999; CANEVAROLO Jr, 2004).

Citam-se como processos de transformação de composições moldáveis em artefatos de borracha, plástico e fibras o vazamento, a fiação por fusão, a compressão, a injeção, a calandragem, a extrusão, o sopro, a termoformação, a fiação seca, a fiação úmida e a imersão (MANO & MENDES, 1999).

Desde a II Guerra Mundial tem havido grande expansão da indústria de polímeros e produtos plásticos, adotando-se novos usos e tecnologias para estes materiais em velocidade surpreendente. Rapidamente os polímeros têm substituído materiais tradicionais como os metais, o vidro e a madeira nos mais diversos campos de aplicação, incluindo indústrias automobilística, alimentícia, eletroeletrônica, construção civil e em produtos especiais, como aqueles destinados a aplicações médicas (RABELLO, 2000).

Os primeiros plásticos sintéticos comercializados sob a forma de artefatos foram a Backelite® (PR) em 1910, e, mais tarde, na década de 30, o PVC, PMMA, e PS. Na década de 40 surgiram LDPE, PUR, e na década de 50 o POM, HDPE, PP e PC. A ampliação da faixa de aplicação dos materiais poliméricos é possível pela síntese de novos polímeros (com estrutura química diferenciada) e pela modificação de polímeros já existentes. Neste último caso, têm-se os copolímeros, as misturas poliméricas e os compósitos.

Os aditivos têm exercido papel fundamental na alteração de importantes propriedades finais dos polímeros originais, onde, através da escolha e dosagem adequados dos componentes pode-se obter materiais poliméricos feitos sob medida para aplicações específicas, como os polímeros usados para aplicações médicas ou ainda conferir estabilidade ao material durante o próprio processamento ou esterilização (MANO & MENDES, 1999; RABELLO, 2000).

2.3.2 Polímeros para aplicação na indústria de produtos médico-hospitalares e biomateriais

O emprego de biomateriais data do início do século XX, quando foi iniciado seu uso em restaurações odontológicas, entretanto, o uso bem sucedido na cirurgia reconstrutiva apenas teve início após a II Guerra Mundial. O progresso nesta área tem crescido desde então, em parte devido à necessidade de atendimento às situações não acomodadas pelo transplante autólogo, e concomitantemente, pelos desenvolvimentos tecnológicos. Adicionalmente, tal situação impulsionou o desenvolvimento de materiais que possuam características adequadas funcionais, mecânicas e de biocompatibilidade (PINTO & GRAZIANO, 2000).

Biomaterial consiste em qualquer substrato natural ou sintético que compreenda, em parte ou no todo, estrutura viva ou dispositivo biomédico que desempenhe, amplie ou substitua alguma função biológica natural. Os requisitos de estabilidade, atoxicidade e ausência de degradação em produtos tóxicos, assim como as questões de adequação em conjunto com a aplicação

específica, originaram o emprego do termo biocompatibilidade na área de biomateriais (PINTO & GRAZIANO, 2000, KATZ, 2001).

O campo de aplicação para o uso dos materiais poliméricos é bastante abrangente e inclui reconstrução de tecido ósseo usando cimento de PMMA, suturas cirúrgicas biodegradáveis de PLGA, material odontológico de polivinilsiloxano, fabricação de lentes de contato usando PPHMA, biomaterial ortopédico fabricado em polietileno de altíssima densidade e próteses de tecidos moles e cartilagens em silicone, além de serem vastamente utilizados em regeneração de pele, ossos, cartilagens e órgãos. Portanto, é necessário que tais materiais tenham garantidos seu emprego seguro e eficaz, tendo em vista o papel que devem desempenhar (KATZ, 2001).

2.3.2.1 Poli (cloreto de vinila) - PVC

O PVC é um dos polímeros de menor custo disponíveis para a fabricação de produtos médico-hospitalares como tubos endotraqueais, tubos de traqueostomia, bolsas de sangue e outros. Alterações incorporadas na estrutura polimérica refletem-se em propriedades mecânicas mais adequadas para aplicações específicas (JAYABALAN, 1995; RABELLO, 2000).

Com relação às principais características deste polímero termoplástico, citam-se as suas elevadas propriedades mecânicas, elevada resistência à chama, pode ser plastificável em ampla faixa e ótima capacidade em receber grandes quantidades de aditivos, sendo a poliadição o principal método de obtenção do polímero (MANO & MENDES, 1999).

Entre os aditivos mais empregados para o PVC estão estabilizantes, espumantes, anti-estáticos, agentes de expansão, reticulantes, modificadores de impacto, nucleantes, doadores de cargas, e, principalmente, lubrificantes e plastificantes como o dioctil-ftalato (DOP) (RABELLO, 2000).

A Figura 1 mostra desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PVC.

Figura 1. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PVC.

Estudo envolvendo a exposição do PVC em plasma de ar ambiente gerado por aplicação de potência de rádio frequência (RF) foi realizado por Kaczmarek e colaboradores, onde filmes de 20µm de espessura foram expostos e posteriormente testados quanto à mudança de superfície envolvendo a característica de molhabilidade (melhorando a adesividade do polímero), que é a propriedade que um material líquido tem em se espalhar sobre a superfície de um sólido promovendo contato íntimo entre ambos (KACZMAREK *et al.*, 2002).

2.3.2.2 Polietileno de alta densidade (HDPE)

Com relação às principais características deste polímero termoplástico, citam-se as suas moderadas propriedades mecânicas e excelente resistência química (MANO & MENDES, 1999).

Entre os aditivos mais empregados para o HDPE estão estabilizantes, anti-estáticos, lubrificantes, agentes de expansão, espumantes, pigmentos, nucleantes, doador de cargas e reticulantes, sendo a poliadição o principal método de obtenção do polímero (RABELLO, 2000).

A Figura 2 mostra desenho esquemático de método de síntese para obtenção do HDPE.

Figura 2. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do HDPE.

Pesquisa envolvendo a exposição de *pellets* de HDPE em sistema de plasma ICP foi realizada por Tajima e Komvopoulos, a fim de se elucidar o grau de modificação topográfico das superfícies expostas, bem como a mudança na propriedade de molhabilidade do polímero (TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006).

Borcia e colaboradores trabalharam com exposição de filmes de HDPE sob plasma de ar atmosférico de barreira dielétrica a fim de estudar a extensão da modificação das camadas superficiais envolvendo a rugosidade, molhabilidade e adesividade do polímero (BORCIA *et al.*, 2004a). Seguindo esta mesma tendência, trabalho de Svorcik e colaboradores submeteram folhas de HDPE de 40µm de espessura sob plasma de gás Ar, tendo verificado aumento significativo na rugosidade superficial do polímero (SVORCIK *et al.*, 2006).

2.3.2.3 Polipropileno (PP)

Com relação às principais características deste polímero termoplástico isotático, citam-se a sua elevada cristalinidade, moderadas propriedades mecânicas, e excelente resistência química (MANO & MENDES, 1999).

Entre os aditivos mais empregados para o PP estão reticulantes, nucleantes, anti-estáticos, espumantes e modificadores de impacto, sendo a poliadição o principal método de obtenção do polímero (RABELLO, 2000).

A Figura 3 mostra desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PP.

Figura 3. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PP.

Filmes de PP de 100µm de espessura foram expostos sob plasma de CO₂ gerado em potência de microondas sob distintas condições de parâmetros de processo. A intenção foi estudar a extensão da modificação topográfica superficial e a alteração na sua rugosidade e energia de superfície (AOUTINI *et al.*, 2003). Outros sistemas de plasma também foram usados para avaliar a extensão da modificação superficial em filmes de PP de 40µm, tendo sido usados plasma sistema corona, sistema de chama e plasma remoto gerado por potência de microondas (STROBEL *et al.*, 1995). Em ambas as pesquisas foram verificadas modificações importantes através do uso de adequados métodos de caracterização de superfície.

2.3.2.4 Poliuretano (PUR)

Com relação às principais características deste polímero termoplástico ou termorrígido, citam-se a sua alta resistência à abrasão e ao rasgamento, bem como sua versatilidade (na dependência dos monômeros e do catalizador) (MANO & MENDES, 1999).

Entre os aditivos mais empregados para o PUR estão agentes de expansão, pigmentos, e espumantes, sendo a policondensação o principal método de obtenção do polímero (RABELLO, 2000).

A Figura 4 mostra desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PUR.

Figura 4. Desenho esquemático de método de síntese para obtenção do PUR.

Amostras de poliuretanos biodegradáveis contendo segmentos hidrofílicos poli (óxido de etileno) e hidrofóbicos poli (caprolactona) foram expostos em sistemas de plasma usando H_2O_2 , O_2 , CO_2 , e NH_3 . Para caracterização das superfícies expostas, dentre outras técnicas foi usada a perfilometria, que evidenciou aumento na rugosidade média (R_a) para a exposição ao H_2O_2 , bem como diminuição, variando conforme o tipo de gás utilizado. Para alguns casos, o valor chegou a ser 200% maior do que a rugosidade inicial comparativamente aos polímeros não expostos, entretanto, os motivos para tal variação foram duvidosos, levando os autores a sugerirem estudos adicionais (GORNA & GOGOLEWSKI, 2003).

2.3.2.5 Policarbonato (PC)

Com relação às principais características deste polímero termoplástico, citam-se as suas excelentes propriedades mecânicas, alta resistência ao impacto, boa estabilidade dimensional, boa resistência às intempéries e à chama (MANO & MENDES, 1999).

Entre os aditivos mais empregados para o PC estão os nucleantes, sendo a poliadição o principal método de obtenção do polímero (RABELLO, 2000).

A Figura 5 mostra desenho esquemático do PC em uma de suas denominações comerciais, o Lexan®.

Figura 5. Desenho esquemático do PC em uma de suas denominações comerciais, o Lexan®.

Borcia e colaboradores trabalharam com exposição de filmes de PC sob plasma de ar atmosférico de barreira dielétrica a fim de estudar a extensão da modificação das camadas superficiais envolvendo a rugosidade e a energia de superfície do polímero. Foram evidenciadas modificações superficiais variáveis e na dependência dos parâmetros adotados (BORCIA *et al.*, 2004b).

2.3.3 Regulamentação aplicável aos produtos médico-hospitalares

Os fabricantes de diferentes materiais poliméricos, com distintas formulações e aditivos, diversificam especificações e descrições responsáveis pelo desempenho e estabilidade dos termoplásticos usados na fabricação de produtos médico-hospitalares. Entre os polímeros mais frequentemente

utilizados na manufatura de tais itens estão o PVC, PC, PP, PUR, PE, PS e poliéster (JAYABALAN, 1995).

Na manufatura de produtos médico-hospitalares são descritos os requisitos básicos com relação às condições de boas práticas de fabricação para tais itens. Considerando a diversidade de produtos, têm-se a classificação de riscos separada em três categorias: risco I (baixo), risco II (médio) e risco III (alto). A primeira se refere aos produtos médicos que, por dispensarem o emprego de procedimentos, técnicas especiais de produção e cuidados ou precauções em seu uso ou aplicação, representam baixo risco intrínseco à saúde de seus usuários, seja paciente ou operador. A segunda categoria dispõe sobre produtos médicos que necessitam de cuidados ou precauções em seu uso ou aplicação. Por fim, a terceira categoria se refere aos produtos que por necessitarem do emprego de procedimentos, técnicas especiais de produção e cuidados, bem como precauções em seu uso e aplicação, representam alto risco intrínseco à saúde de seus usuários. Nesta categoria encontram-se, por exemplo, os produtos invasivos a longo prazo e os implantes (BRASIL, 1994).

Outro ponto importante abordado na legislação refere-se ao registro dos produtos, sendo necessário que a documentação contemple o atendimento de alguns requisitos por parte do fabricante, como a descrição detalhada do produto, seu conteúdo, composição, indicação e finalidade de uso, precauções, restrições, advertências, cuidados especiais, condições de armazenamento e transporte, descrição detalhada das etapas de processamento até obtenção do produto acabado e descrição de eficácia e segurança do produto (BRASIL, 2001).

Apesar da extensa utilização de produtos médico-hospitalares fabricados em polímeros, a legislação brasileira não descreve detalhados aspectos pertinentes com relação ao processamento e controle de qualidade de polímeros distintos. Alguns dados detalhados estão disponíveis para o PVC e especificamente sua utilização na fabricação de bolsas plásticas para o acondicionamento de sangue humano e seus componentes. Estão descritas informações como condições de fabricação, impressão, composição de solução preservadora (anticoagulante) permitida, esterilização, acondicionamento, rotulagem, requisitos para os acessórios e outros. Com relação à inclusão de

aditivos, ressalta-se a ausência de corantes ou pigmentos, limites para o principal aditivo (DOP ou dioctil ftalato) e limites para determinados íons e metais (BRASIL, 1988).

Tal omissão pode-se justificar pelo elevado número de inovações sob sigilo de patentes que ocorrem para polímeros inovadores dimensionados para aplicações específicas.

2.4 Métodos de caracterização e avaliação da biocompatibilidade de polímeros

2.4.1 Introdução

Distintos graus de informação podem ser obtidos a respeito do comportamento da superfície e da massa interna ou *bulk* dos polímeros, na dependência dos métodos escolhidos para tais estudos. A escolha destes métodos é influenciada por alguns fatores como natureza da avaliação requerida, extensão e profundidade da área analisada, tipo de interação entre a técnica e a superfície a ser analisada, adequação entre amostra e metodologia escolhida, preparação da amostra, limitações impostas pela superfície do polímero analisado, precisão e exatidão do método, facilidade de uso, custo e disponibilidade do equipamento/instrumental necessário.

É preciso ressaltar que as distintas técnicas de caracterização de polímeros reúnem vantagens e desvantagens, assim, uma cuidadosa análise de todos os pontos envolvidos pode esclarecer sobre a mais adequada escolha, contribuindo para o alcance dos objetivos propostos na pesquisa do comportamento de tais materiais, sendo que para a obtenção de respostas com o devido embasamento científico, é necessária a utilização de várias tecnologias concomitantemente.

Também os métodos biológicos são de extrema importância na avaliação objetivando o uso de um polímero como biomaterial, portanto, devem ser adequadamente dimensionados para complementar um amplo estudo sobre o comportamento desses materiais, principalmente tendo em vista que

alterações superficiais interferem diretamente na biocompatibilidade de polímeros (STROBEL *et al.*, 1995; KACZMAREK *et al.*, 2002; TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; SVORCIK *et al.*, 2006; AOUTINI, 2003).

Dentre as técnicas adequadas para proporcionar estudo abrangente, citam-se métodos espectroscópicos, microscópicos, termodinâmicos, e outros complementares, como métodos biológicos (MERRET *et al.*, 2002; USP 29, 2006). Foram utilizados no presente trabalho a espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR), a microscopia eletrônica de varredura (SEM), a perfilometria, a microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) e a citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em agar.

2.4.2 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)

A espectroscopia pode ser definida como o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria por absorção, emissão e espalhamento da radiação. Portanto, a espectroscopia vibracional configura ferramenta poderosa na identificação, determinação de grupos funcionais e estudos conformacionais e estruturais de polímeros, permitindo a obtenção do espectro vibracional completo da molécula (KAWANO, 2004).

As moléculas apresentam vibrações normais que podem ser do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção. A vibração normal de estiramento pode ser do tipo simétrico, anti-simétrico, degenerado, em fase, fora de fase e pulsação ou respiração de anel. Já a vibração normal de deformação angular pode ser do tipo simétrico, *wagging*, *twisting*, *rocking*, degenerado, no plano, fora do plano, deformação de anel e torção (KAWANO, 2004).

Num espectro vibracional, além das bandas fundamentais, podem aparecer outras bandas, tais como as do tipo combinações por soma ou por diferença e as bandas harmônicas (múltiplos de uma banda fundamental). Na

região de freqüências baixas ($<500\text{cm}^{-1}$), podem aparecer bandas de torção, bandas de modo de rede (devido aos movimentos de uma cadeia em relação a outras) e bandas devidas ao modo acústico (vibração de cristais). Além disso, algumas bandas poderão apresentar-se desdobradas, devido à existência de vibrações normais, fundamental em fase e fora de fase de grupos adjacentes, numa cadeia ou entre duas vibrações normais de cadeias próximas, no interior de uma célula unitária. Assim, as freqüências vibracionais de uma molécula dependem da natureza do movimento, massa dos átomos, geometria da molécula, natureza das ligações químicas e ambiente físico/químico (KAWANO, 2004).

A espectroscopia de absorção no infravermelho (IR) pode ser dividida em três regiões distintas: IR afastado (10 a 400cm^{-1}) IR médio (400 a 4.000cm^{-1}) e IR próximo (4.000 a 12.820cm^{-1}). A maior parte dos estudos em IR referem-se à região média, onde se localizam as freqüências vibracionais fundamentais, sendo que a região que compreende freqüência entre 400 e 1.800cm^{-1} é conhecida como região da impressão digital, pois é nessa região que aparecem a maior parte das freqüências vibracionais fundamentais (KAWANO, 2004).

A obtenção do espectro IR pode ser realizada de modos diferentes, onde os mais utilizados para o estudo de polímeros são: transmissão ou absorção, reflectância total atenuada (ATR), reflectância difusa (DRIFTS), reflectância especular, microscopia no infravermelho e fotoacústico no infravermelho (PAS).

O efeito fotoacústico foi descoberto por Alexander Graham Bell em 1880, mas sua aplicação prática só foi desenvolvida em 1970 a 1980. Bell mostrou que um sinal audível pode ser obtido diretamente ao interromper rapidamente um raio de luz com um disco rotativo dotado de fendas. O raio então pode ser focalizado sobre o selênio ou qualquer sólido sob a forma de diafragmas conectados a um sistema de audição. Ele demonstrou que o efeito fotoacústico baseou-se na absorção de luz e que o sinal resultante foi proporcional à intensidade da luz incidente. Como suas investigações, contudo, basearam-se no uso da audição como mecanismo detector, poucos projetos envolveram esse método, até que equipamentos adequados foram desenvolvidos nos anos 70 (CIURCZAK, 1999).

O PAS-FTIR é um método indireto de se obter o espectro vibracional no IR, ou seja, a radiação IR modulada incidente é absorvida pela amostra até uma dada profundidade. A energia absorvida é convertida em energia térmica por um processo de relaxação não radioativo e, devido à modulação da radiação IR, cria-se uma flutuação térmica periódica, que se difunde até a superfície da amostra, onde é gerada uma onda de pressão sonora na interface amostra/gás (hélio gasoso). Essa pressão é detectada por um microfone de alta sensibilidade que converte a onda sonora em sinal elétrico, o qual é finalmente amplificado e conectado ao circuito eletrônico do equipamento. O sinal detectado pelo microfone versus a diferença do caminho óptico resulta num interferograma que, pela aplicação da transformada de Fourier, dá origem a um espectro IR (KAWANO, 2004).

Dentre as vantagens da espectroscopia fotoacústica (pouca ou nenhuma preparação da amostra, característica não destrutiva, de fácil manuseio) está seu poder de penetração, onde variando-se a frequência do anteparo, é possível regular a profundidade de penetração do sinal modulado. Assim, podem-se fazer varreduras em diferentes profundidades da amostra (nm, μm até mm) (CIURCZAK, 1999).

Na determinação da orientação molecular de filmes de poli (tereftalato de etileno) - PET, foi usada a técnica de PAS-FTIR comparativamente ao ATR-FTIR. Foram obtidos dois espectros que se complementam, sendo que a primeira técnica evidenciou bandas diferenciadas que somente ficaram evidentes devido à profundidade alcançada pela técnica fotoacústica (KRISHNAN *et al.*, 1982). A complementariedade de informações obtidas por técnicas de caracterização de polímeros foi evidenciada também entre a espectroscopia fotoacústica (PAS-FTIR) e espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS) na avaliação dos efeitos decorrentes de processo de corrosão aplicado a dióxido de silício (sílica) (GARDELLA *et al.*, 1983).

A capacidade da metodologia PAS-FTIR em atingir diferentes graus de profundidade de materiais foi avaliada por Yang em experimento envolvendo a distribuição de produtos de degradação em nível superficial e profundo de amostras de fibras de PP e algodão tratadas quimicamente com composto anti-chamas (YANG, 1992).

Trabalho de Ryczkowski e Pasieczna descreve a excelente aplicabilidade do PAS-FTIR em conjunto com a espectroscopia Raman na atribuição de bandas bem definidas e fundamentais para caracterização de superfícies poliméricas submetidas a distintos processos de tratamento como homopolimerização de hidroxipropil-metacrilato, fotoxidação de copolímero estireno-isopreno e fotoxidação de filmes poli-octenâmeros (RYCZKOWSKI & PASIECZNA, 2003)

2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM) tem sido muito utilizada em conjunto com outras técnicas de caracterização de polímeros e outros materiais, fornecendo informações valiosas a respeito do aspecto visual de inúmeros tipos de superfícies e subsídios na investigação do seu comportamento frente a situações de distintas naturezas, como efeitos físicos e morfológicos decorrentes de diferenciados processos de tratamento de superfícies (BORCIA *et al.*, 2004a; SVORCIK *et al.*, 2006; CLODE, 2006; SVORCIK *et al.*, 2006)

A microscopia eletrônica de varredura tem encontrado vasta aplicabilidade no estudo da superfície polimérica e também na resposta celular aos biomateriais. Esta técnica faz uso de um feixe primário de elétrons capaz de interagir com a amostra de interesse, em ambiente de vácuo, resultando em diferentes tipos de ondas eletrônicas e eletromagnéticas sendo emitidas. Os elétrons secundários ejetados a partir da amostra são coletados e visualizados, resultando numa fotomicrografia de alta resolução (MERRET *et al.*, 2002).

A preparação da amostra envolve fixação (se necessário), posicionamento ao porta-amostra metálico e cobertura da amostra com uma camada metálica de 20 a 30nm de espessura previamente à análise. O metal usado deve ser condutivo e incluem normalmente ouro, platina ou mistura ouro/paládio. Após a inserção da amostra, a aquisição das imagens é muito

rápida e pode ser obtida sob várias ordens de grandeza, podendo chegar até em 200.000 vezes (MERRET *et al.*, 2002).

Sammons e Marquis usaram reduzida pressão de vácuo para possibilitar a visualização de imagens provenientes de células de tecido ósseo aderidas em substrato polimérico sem a camada de cobertura metálica. Também as amostras metalizadas com ouro, prata e carbono foram comparadas. A qualidade das imagens geradas demonstrou a eficiência do procedimento tendo sido equivalentes ambas as amostras metalizadas e não metalizadas (SAMMONS & MARQUIS, 1997).

Melhoramento adicional envolvendo a execução da técnica analítica foi obtido por Clode (2006), que avaliou a utilização de diferentes pressões de vácuo, proporcionando ausência de camada superficial de metal condutivo para possibilitar visualização das imagens, bem como incrementando aspectos relacionados à qualidade das imagens fornecidas pelo equipamento.

Recentemente a tecnologia sofreu algumas modificações envolvendo a remoção de alto vácuo e introduzindo ionização gasosa no ambiente analítico. Dentre as principais vantagens citam-se a possibilidade de observação de amostras que liberam partículas sólidas ou gasosas sem danificar o instrumento, observação de amostras não-condutivas, observação de amostras com alto conteúdo de água sem a necessidade de prévia secagem e observação da dinâmica de certos processos no momento em que eles ocorrem (hidratação, desidratação, congelamento, aquecimento e testes de compressão e tensão) (MANERO *et al.*, 2003).

2.4.4 Perfilometria

A perfilometria se destina a mensurar a rugosidade de uma superfície, no qual se utiliza o contato mecânico (físico) de um sensor com a mesma. Desta forma, o desvio vertical deste sensor é medido em função da sua posição horizontal, podendo-se obter imagens bi-dimensionais e tri-dimensionais e permitindo avaliar os valores de altura dos vários degraus (VERDONCK, 1998).

O funcionamento desse sistema engloba o posicionamento de um fragmento da amostra numa plataforma interna de forma a permanecer num ângulo de 90° em relação à agulha (sensor). O procedimento envolve também ajuste do equipamento para medir rugosidade de material desconhecido. Para o início da varredura, permite-se o deslocamento da agulha verticalmente à amostra até que esta seja tocada e aciona-se o comando para a realização da varredura de 1mm. Ao final da varredura, a agulha separa-se automaticamente da amostra, retrocedendo à sua posição inicial. Os valores obtidos para a rugosidade de uma determinada superfície representam a relação entre a altura medida (h) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira (y), sendo, portanto, útil na obtenção do perfil de rugosidade de uma determinada superfície polimérica (VERDONCK, 1998).

Na avaliação da rugosidade de diferentes biocerâmicas utilizadas como substrato para o crescimento de células derivadas de ossos humanos, a técnica de perfilometria mostrou-se ferramenta útil. Tendo em vista a busca por métodos que aumentem a biocompatibilidade de próteses, foi verificado que o aumento da rugosidade influenciou a biocompatibilidade das células, juntamente com as características químicas de tais substratos (ZREIQAT *et al.*, 1999).

Em estudos de processos por plasma, a técnica de perfilometria evidenciou padrões de aumento e diminuição na rugosidade média (Ra) quando do tratamento de amostras de poliuretanos biodegradáveis, variando conforme o tipo de gás utilizado. Para algumas amostras, o valor obtido chegou a ser 200% maior do que a rugosidade inicial, comparativamente às amostras não submetidas à exposição por plasma. Entretanto, os motivos para tal variação foram duvidosos, levando os autores a sugerir investigações complementares (GORNA & GOGOLEWSKI, 2003).

2.4.5 Microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS)

Em adição à obtenção de imagens da superfície de polímeros, o microscópio eletrônico de varredura (SEM) pode ser acoplado em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) para possibilitar identificação e quantificação de elementos químicos da amostra.

Considerando os polímeros como amostras a serem submetidas a esta técnica, apresentam baixa emissividade eletrônica, baixa condutividade térmica e elétrica, assim como baixo conteúdo de água. Embora esta última característica seja desejável sob o ponto de vista de tratamento da amostra, paradoxalmente dificulta a estabilização das ligações químicas frente ao feixe eletrônico, o que deve ser considerado no momento do estabelecimento dos parâmetros relacionados à análise (GOLDSTEIN *et al.*, 1992).

Neste sentido, trabalho de Themner e colaboradores investiga as modificações de parâmetros para a operação do equipamento, principalmente a variação da intensidade de emissão de prótons, exercendo influência direta na perda de massa da amostra analisada (e na precisão da metodologia), especialmente em relação a polímeros, amostras biológicas (tecidos) e proteínas (gelatina) (THEMNER *et al.*, 1990).

O funcionamento do método baseia-se na interação entre o feixe de elétrons e a amostra, que, quando é atingida, têm seus átomos excitados e, ao voltarem ao estado fundamental, emitem fótons com energias características do átomo. Os fótons são assim identificados em termos de sua energia e contados pelo detector de raios X localizado no interior da câmara de vácuo. Desta forma o sistema gera o espectro relativo ao número de contagens em função da energia, em keV, identificando os elementos químicos presentes na amostra. Além dos espectros, o sistema realiza análise de pontos, linhas e regiões definidas sobre a imagem capturada da amostra e gera também mapa dos elementos sobre a imagem obtida (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

A microanálise pode coletar informações sobre possíveis mudanças na distribuição atômica dos polímeros, representando também recurso adicional a

fim de elucidar o grau de oxidação das primeiras camadas superficiais expostas, através da obtenção das concentrações elementares das amostras em percentagem e sua posterior razão atômica entre oxigênio e carbono (O/C) (STROBEL *et al.*, 1995; LEROUGE *et al.*, 2000a; SIDOUNI *et al.*, 2001; AOUINTI *et al.*, 2003; GORNA & GOGOLEWSKI, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; VINOGRADOV & LUNK, 2005; WANG *et al.*, 2005).

A determinação quantitativa do elemento enxofre em matrizes copoliméricas (sulfonato metalil de sódio-SMAS, sulfonato estireno de sódio-SSS e ditiazona-DTH) foi efetuada por SEM em sistema EDS. O método revelou-se apto a detectar baixíssimas concentrações de elementos presentes na amostra como “traços” (RAO & PANDEY, 1991). Seguindo esta tendência, Taubert e Winey constataram que a técnica representa poderosa ferramenta na determinação de traços do elemento sódio em agregados e matrizes de polietileno (ácido metacrílico) (TAUBERT & WINEY, 2002).

Modificação da técnica através do uso de dispositivo de derivatização eletrônica com nível de resolução lateral de cerca de 1µm foi desenvolvida por Sugiura e colaboradores (2001) para a determinação de grupos funcionais em polímeros derivatizados, Nylon-6 e copolímero de etileno e carbono. Os resultados mostraram incremento no limite de detecção, na sensibilidade (cerca de trinta vezes superior) e na resolução lateral quando comparado a espectroscopia no IR, habilitando o método para estudos de caracterização/ degradação polimérica (SUGIURA *et al.*, 2001).

2.4.6 Citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em ágar

Em função das possíveis alterações que o processo empregando plasma possa acarretar a polímeros e biomateriais, principalmente tendo em vista a superfície e, portanto, sua biocompatibilidade, faz-se necessária a avaliação o grau de comprometimento da segurança biológica dos polímeros expostos quanto à citotoxicidade. O método de difusão em ágar revela-se

então adequado para proceder a esta avaliação e está descrito em compêndios oficiais e normas internacionais (ISO, 1999; USP 29, 2006), apresentando como vantagens a sensibilidade, facilidade na execução, reprodutibilidade, baixo custo, além de atender à tendência mundial em suprimir o uso de modelos animais experimentais.

Apesar da descrição de outros testes biológicos aplicáveis a polímeros na USP 29, como o teste de injeção intradérmica, teste intracutâneo e teste de implante muscular, que permitem avaliar a toxicidade dos materiais ou seus extratos, esforços têm sido feitos para tentar a substituição dos testes empregando animais, buscando estudar a correlação entre as respostas obtidas por testes *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, a norma “ISO 10.993-5: *Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: ‘in vitro’ methods*” recomenda que sempre que possível priorizar o uso de testes *in vitro* (ISO, 1999; USP 29, 2006).

O termo cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular através de desagregação enzimática, mecânica ou química. Nos anos 1940, o desenvolvimento dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos possibilitaram o desenvolvimento dos experimentos com as culturas de tecidos, impulsionando ampla gama de pesquisas (FRESHNEY, 1987).

A primeira linhagem celular isolada a partir de tecido subcutâneo de camundongo recebeu o nome de linhagem L, e através de clonagem, procedeu-se o isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929, utilizada até hoje nas pesquisas envolvendo citotoxicidade. Desde então, as técnicas de culturas celulares são amplamente empregadas, apresentando baixo custo, facilidade de manutenção e demanda pouco espaço físico, podendo ser utilizadas nas mais diferenciadas pesquisas, principalmente na avaliação da toxicidade dos mais variados produtos. A verificação da viabilidade celular envolve a sobrevivência e/ou proliferação celular e podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais (CRUZ, 2003).

Visando agregar informação a respeito da biocompatibilidade de polímeros com diversas aplicabilidades, células de fibroblastos de camundongo

linhagem NCTC clone 929 foram utilizadas em estudos de toxicidade de implantes confeccionados em compósitos de polietileno de altíssima densidade e poli-dimetilsiloxano (KHORASANI *et al.*, 2005), bem como filmes de poli (caprolactona) a serem dimensionados como potenciais cimentos em engenharia de tecidos (SERRANO *et al.*, 2005).

A literatura descreve dois principais corantes usados para esta finalidade, o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina.HCl). O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação do corante (CRUZ, 2003).

Catéteres urinários de látex foram avaliados frente à quatro ensaios e comparados entre si (citotoxicidade em cultura celular, injeção intracutânea dos extratos em coelhos, implante intramuscular dos fragmentos dos catéteres em coelhos e cateterização de ovelhas no teste de irritação de mucosa). Considerando principalmente sensibilidade e aplicabilidade prática, o teste de citotoxicidade em cultura celular com captura de vermelho neutro se mostrou adequado na avaliação da segurança de tais itens (GRAHAM *et al.*, 1984).

A biocompatibilidade de implantes ortopédicos foi avaliada utilizando cultura de osteoblastos e fibroblastos, tendo a citotoxicidade sido mensurada através de algumas características como alterações celulares, conteúdo de proteínas, perda de enzima pela membrana celular e ensaio de viabilidade usando o MTT. Este último mostrou-se adequado para atestar a segurança de tais implantes (MORRISON *et al.*, 1995).

Compósitos de poli-etilenoglicol (trimetil) chitosana em diversos graus de substituição tiveram a sua biocompatibilidade avaliada através de ensaio usando o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT). Os resultados mostraram diferentes respostas celulares, dependendo da estrutura obtida após a síntese, portanto, os autores sugerem adicionais investigações, na tentativa de ser bem sucedida a utilização de tais compósitos como veículos de liberação de fármacos (MAO *et al.*, 2005).

3 . OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo proceder a estudos que permitam conhecimento da eficácia esterilizante de processos empregando plasma em produtos médico-hospitalares (drenos torácicos e sondas nasogástricas) de natureza polimérica, configuração tubular, longa extensão e calibre reduzido. Os *lumens* desses materiais foram preenchidos com suportes vítreos (lamínulas de 8 x 18mm) intencionalmente contaminados com biosensores (esporos de alta resistência), sob biocargas de proporção reduzida e condições padronizadas, constituindo os monitores biológicos.

Adicionalmente, foram objeto de investigação polímeros distintos utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares, a fim de esclarecer a influência do plasma sobre as características intrínsecas desses materiais.

Os materiais acima foram submetidos a ciclos sub-letais por plasma sob distintas combinações de parâmetros envolvendo a formação do plasma, a saber: modos de geração, gases de origem, pressões, vazões de gás, umidade relativa, temperatura, potências de rádio-freqüência e tempos de exposição.

Para isso foram utilizados dois reatores, sendo o primeiro um sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e o segundo um sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP).

Após os ciclos sub-letais, os monitores biológicos foram submetidos à análise microbiológica através de enumeração de possíveis esporos sobreviventes, provendo informação quanto à letalidade dos biosensores e eficácia do processo. Já os polímeros distintos foram expostos a ciclos empregando plasma selecionados de forma diferenciada e posterior aos ciclos sub-letais, seguindo para análises envolvendo técnicas de caracterização, a saber: espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR), microscopia eletrônica de varredura (SEM), perfilometria, microanálise em sistema *Energy Dispersive*

Spectroscopy (EDS) e método biológico de difusão em ágar para avaliação de citotoxicidade *in vitro*. O objetivo foi avaliar a compatibilidade do processo esterilizante por plasma com esses materiais, principais matérias primas na confecção de produtos médico-hospitalares de natureza termossensível.

4 . MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para os estudos de eficácia esterilizante foram usados três tipos de produtos médico-hospitalares: dreno torácico em poli (cloreto de vinila) - PVC com diâmetro interno de 7mm; dreno torácico em PVC com diâmetro interno de 9mm; sonda nasogástrica em PVC com diâmetro interno de 1 mm.

A fim de possibilitar os estudos descritos anteriormente, foi desenvolvido em laboratório trabalho de obtenção de lotes de suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 (PINTO, 1991; OLIVEIRA, 2000), padronizados quanto à carga microbiana e densidade celular.

Com relação aos estudos de compatibilidade, foram empregadas chapas de 1mm de espessura de polímeros distintos: poli (cloreto de vinila) - PVC, polietileno de alta densidade (HDPE), polipropileno (PP), poliuretano (PUR) e policarbonato (PC), adquiridos no mercado nacional (produtor local).

Todos os materiais acima foram submetidos a ciclos sub-letais por gás plasma utilizando reatores disponíveis no Laboratório de Sistemas Integráveis do Departamento de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da USP, tanto no sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE), Figura 15, como contemplando sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP), Figura 17.

4.2 Métodos

Fluxograma dos experimentos

4.2.1 Obtenção das suspensões de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372

O cultivo e operações subseqüentes para a obtenção dos esporos do microrganismo de escolha – *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, que tem sido considerado em nova classificação como *Bacillus atrophaeus* (FRITZE & PUKALL, 2001), abrangeram as diferentes etapas a seguir descritas (PINTO, 1991; PINTO & SAITO, 1992; OLIVEIRA, 2000).

4.2.1.1 Repiques de manutenção

Foi utilizada cepa padrão do microrganismo anteriormente descrito, cujos repiques de manutenção foram feitos em tubos de ensaio contendo ágar para dosagem de antibióticos nº 1 (Merck, Darmstadt, Germany), em superfície inclinada, esterilizados em autoclave a vapor. Foi a seguir efetuada a incubação dos tubos inoculados à temperatura de $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ por 24h. Decorrido este tempo foram transferidas, em condições assépticas para câmara de fluxo laminar marca VECO®, modelo VLFS 12 (VECO, Campinas, Brasil), alçadas do tubo inclinado para volume de 100mL de caldo caseína de soja (Difco, Detroit, MI, USA), estéril e contido em tubo de ensaio de (37 x 200)mm. A incubação seguiu condições idênticas às anteriormente descritas.

4.2.1.2 Obtenção de esporos

Da suspensão anterior, alíquotas de 5mL foram inoculados em distintas garrafas de Roux contendo 200mL de ágar para esporulação composto (PINTO, 1991; PINTO & SAITO, 1992; OLIVEIRA, 2000), conforme descrito na Tabela 1:

Tabela 1. Composição do ágar para esporulação do microrganismo *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372.

Componente	Quantidade (g)
Extrato de levedura	8,00 g
Caldo nutriente	4,00 g
Sulfato de manganês tetrahidratado	0,05 g
Cloreto de cálcio hexahidratado	0,05 g
Agar	30,00 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Trabalhou-se simultaneamente com oito garrafas de Roux preenchidas com 200mL de ágar para esporulação cada, previamente esterilizadas em autoclave (121°C, 15min) em ciclo único, e inoculadas a partir de suspensão de repique de manutenção .

Em continuidade, procedeu-se à incubação das garrafas de Roux nas mesmas condições indicadas para repiques de manutenção, porém por períodos de cerca de 12 a 15 dias, durante o qual diariamente foi removida parte da massa microbiana utilizando-se alça de platina estéril para confecção de esfregaços e acompanhamento do grau de esporulação.

O procedimento anteriormente descrito para cada oito garrafas de Roux foi repetido quatro vezes, originando quatro grupos denominados G1, G2, G3 e G4.

4.2.1.3 Acompanhamento do grau de esporulação

Os esfregaços obtidos a partir da massa microbiana de cada garrafa foram fixados e submetidos à coloração de *wirtz-conklin*, utilizando solução aquosa de safranina e verde malaquita (BIER, 1977).

O procedimento consistiu em aplicar a solução saturada de verde malaquita sobre o esfregaço, mantendo-se por 10min sob leve aquecimento, seguindo-se lavagem com água destilada, aplicação da solução de safranina por 30s, enxágüe com água destilada e secagem.

Após a contagem de dez campos microscópicos, foi determinada para cada garrafa de Roux a porcentagem de esporos em relação ao total de células vegetativas. Quando atingido o grau de esporulação de cerca de 95%, o que ocorreu por volta do 12º dia, foi interrompida a incubação.

4.2.1.4 Recolhimento e lavagem dos esporos

A massa celular resultante do crescimento no ágar foi recolhida de cada garrafa com 30mL de água destilada estéril, utilizando o auxílio de 12g de pérolas de vidro e passando a suspensão obtida por filtro constituído de duas camadas de tecido de poliéster estéril. Foram feitas lavagens sucessivas com água destilada estéril e, a seguir, centrifugação a 3.000rpm durante 60min para completa separação, em centrífuga Fanem® modelo Excelsa II 206 (Fanem, São Paulo, Brasil), previamente calibrada, equipada com cruzeta angular. O material centrifugado foi retomado em água destilada estéril e submetido a tratamento térmico.

4.2.1.5 Tratamento térmico

A fim de eliminar possíveis microrganismos na forma vegetativa, contaminantes ou não, a suspensão de esporos foi submetida a tratamento térmico em banho-maria a $(70 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, durante 30 min. A suspensão foi então mantida em *freezer* a cerca de -10°C até o próximo estágio. Este procedimento

foi repetido quatro vezes para cada grupo de oito garrafas, originando quatro grupos de suspensões de esporos distintos.

4.2.2 Padronização das suspensões de esporos

Tendo sido reunidos em um único recipiente os quatro grupos de suspensões de esporos anteriormente obtidos, o procedimento de padronização do *pool* de esporos foi iniciado com a promoção de choque térmico (70°C por 15min) para ativação dos esporos, seguindo-se diluições decimais em água destilada estéril, sendo as diluições de 10^{-6} a 10^{-11} submetidas a contagem, em triplicata, pela técnica de semeadura em profundidade *Pour Plate* (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ed., 1998; PINTO *et al.*, 2003), usando cerca de 15 mL de ágar caseína soja (Difco, Detroit, MI, USA) estéril por placa. Após solidificação, foi adicionada camada extra de 5mL do mesmo meio de cultura *overlay*, de forma a uniformizar a disponibilidade de oxigênio às colônias bacterianas, otimizando a contagem. A incubação das placas foi na posição invertida em estufa a $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 24h, seguindo-se contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônias). Este procedimento foi repetido três vezes em três ocasiões distintas, tendo sido a contagem feita em triplicata de placas de Petri.

O *pool* de esporos então padronizado foi subdividido em alíquotas iguais de 10mL em tubos de ensaio (20mm x 150mm), sendo o número obtido representativo para todas as alíquotas, tendo em vista a condição de uniformidade entre as mesmas e a seguir mantidas em *freezer* a cerca de -10°C até os próximos estágios. Posteriormente, cada alíquota subdividida foi descongelada e utilizada para diluições sucessivas, a fim de totalizar a carga microbiana desejada para possibilitar inóculo em suportes constituídos de lamínulas de vidro de 8mm x 18mm e introduzidas no interior dos produtos médico-hospitalares selecionados em suas posições centrais, constituindo então os monitores biológicos.

4.2.3 Padronização da densidade da carga de esporos inoculada nos monitores biológicos

Partindo de uma das alíquotas de 10mL da suspensão padronizada e descongelada do *pool* de esporos conforme item 4.2.2, foram realizadas, sob fluxo laminar, diluições seriadas em água destilada estéril de forma a permitir a obtenção de nove soluções contendo 10^3 células por alíquota, como segue: 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L, 80 μ L, 90 μ L e 100 μ L. As alíquotas foram inoculadas em lamínulas distintas de 8mm x 18mm previamente esterilizadas em estufa a 100°C por 4h e posteriormente submetidas à secagem sob fluxo laminar por 1h. A seguir, as lamínulas foram acondicionadas em placas de Petri de vidro estéreis, seguindo-se a varredura das amostras por microscopia eletrônica. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura (Figura 7) marca Phillips®, modelo SEM 515 (USA), tendo sido as amostras preliminarmente submetidas à deposição de ouro em câmara sob vácuo (Figura 6) do equipamento marca Edwards, modelo “sputter coater 5150B” (USA), sob 0,2Torr de pressão, gás argônio, tempo de bombardeamento de 3min, corrente de 1.000 volts, e espessura de 200Å .

Figura 6. Equipamento de deposição de ouro marca Edwards, modelo “sputter coater 5150B”.

Figura 7. Microscópio eletrônico de varredura marca Phillips®, modelo SEM 515.

4.2.4 Validação do método de recuperação de esporos inoculados em solução utilizando filtração esterilizante

A partir de nova alíquota de 10mL padronizada conforme item 4.2.2 e descongelada do *pool* de esporos, foram realizadas diluições seriadas que permitissem atingir alíquotas contendo 10^3 esporos em 20 μ L de água destilada, alíquotas estas que foram inoculadas em três tubos distintos de 37mm x 200mm contendo 50mL de água destilada. Posteriormente os tubos foram submetidos à agitação em Vortex, marca IKA®, modelo MS2 (IKA, Wilmington, NC, USA), ao qual se imprimiu 3.000rpm por aproximadamente 2min. A seguir, os tubos foram submetidos a choque térmico (70°C por 15min) e transferidos para capela de fluxo laminar, onde foi completado o volume dos tubos para 100mL com água destilada estéril. A seguir, o volume de cada um dos três tubos foi subdividido em quatro alíquotas de 25mL e submetido à filtração esterilizante (CHAN-MYERS *et al.*, 1997; CHU *et al.*, 1999; PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000) em quatro membranas de 47mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45 μ m, cada uma acoplada entre copo receptor e coletor Sterifil® (Millipore, Beldford, MA, USA). A passagem das alíquotas através da membrana foi possibilitada por bomba de vácuo marca Millipore®, modelo WP 6111560, com capacidade de vácuo de 700mm Hg, como mostra a Figura 8.

Figura 8. Sistema filtrante Sterifil® acoplado à bomba de vácuo Millipore®.

A seguir, cada uma das membranas foi retirada do sistema filtrante “Sterifil®” com auxílio de pinça e depositada em placa de Petri contendo cerca de 15mL de ágar caseína-soja estéril solidificado por placa, como mostra a Figura 9. A incubação das placas foi na posição invertida em estufa a $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 24h, seguindo-se contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Este procedimento foi repetido três vezes em três ocasiões distintas, tendo sido a contagem feita em triplicata de placas de Petri.

Figura 9. Placa de Petri contendo ágar caseína soja e membrana esterilizante de 47mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45 μ m, após 24h de incubação.

4.2.5 Preparação dos monitores biológicos e comprovação da estanqueidade

Como primeira etapa deste estudo, foram confeccionados dois tipos de monitores biológicos, utilizando três tipos de produtos médico-hospitalares adquiridos no mercado nacional (produtor local) e confeccionados em PVC, já embalados e estéreis, os quais tiveram suas embalagens originais abertas e foram fragmentados sob fluxo laminar em comprimentos adequados para proporcionar a confecção dos dois monitores distintos, como segue:

Figura 10. Monitor biológico A (MB-A).

Monitor biológico A:

- Conector central: dreno torácico 39FR com 9mm de diâmetro interno;
- Prolongamentos: dreno torácico 28FR com 7mm de diâmetro interno.

Figura 11. Monitor biológico B (MB-B).

Monitor biológico B:

- Conector central: dreno torácico 39FR com 9mm de diâmetro interno;
- Prolongamentos: sonda nasogástrica com 1mm de diâmetro interno.

O comprimento total do monitor biológico A foi de 64cm (4cm de conector central e 60cm de prolongamento bilateral total), à semelhança do comprimento total do monitor biológico B, que foi de 64cm (4cm de conector central e 60cm de prolongamento bilateral total). Em razão da grande diferença de diâmetros entre as peças do monitor biológico B, foi necessária a inclusão de dois adaptadores (borrachas de látex) bilateralmente, proporcionando acoplamento adequado entre o dreno torácico e a sonda nasogástrica.

Após terem sido preparados, ambos os monitores biológicos foram imersos em cubas distintas contendo água destilada, sendo que uma das extremidades de ambos foi conectada a bomba de vácuo (Millipore, Beldford, MA, USA) e a outra permaneceu imersa. O equipamento esteve ligado por 5min, período este em que foi promovida passagem de fluxo de ar positivo por todo espaço interno aos monitores biológicos, seguido de bloqueio de ambas as extremidades a cada 30s e liberação por 5s, criando situação de pressurização que permitiu verificar possíveis vazamentos que poderiam comprometer a estanqueidade dos mesmos.

4.2.6 Inóculo dos monitores biológicos

Após descongelamento de mais uma alíquota de 10mL do *pool* padronizado de esporos conforme item 4.2.2 à temperatura ambiente, as operações de diluição foram feitas de modo a se obter solução contendo 10^3 células em 20 μ L.

A transferência das alíquotas de 20 μ L foi feita em suportes constituídos de lamínulas de vidro de 8mm x 18mm esterilizados em estufa a 100°C por 4h, e efetuada em capela de fluxo laminar, onde os suportes foram posicionados em placas de Petri de vidro esterilizadas. Após cuidadosa assepsia e, posteriormente com a luz UV desligada, as alíquotas foram distribuídas sob agitação intermitente em Vortex, marca IKA®, modelo MS2 (IKA, Wilmington, NC, USA), sob 3.000rpm e utilizando pipetador automático de volume variável de 20

a 200 μ L marca Finn timer® (Labsystems, Helsinki, Finland), seguindo-se secagem por tempo de 1h.

Ainda sob fluxo laminar, os suportes inoculados contendo a carga cerca de 10^3 esporos por suporte foram inseridos no interior dos conectores centrais (drenos torácicos 39FR com 9mm de diâmetro interno), seguindo-se a conexão dos respectivos prolongamentos (dreno torácico 28FR com 7mm de diâmetro interno e sonda nasogástrica com 1mm de diâmetro interno), constituindo então os monitores biológicos A e B, respectivamente.

Os monitores biológicos foram acondicionados em dispositivos constituídos de placas de Petri de alumínio perfuradas lateralmente de 150mm de diâmetro estéreis (Figuras 12 e 13) e posteriormente tampadas, a fim de permitir sua abertura somente no momento da exposição aos ciclos esterilizantes e contagem posterior, evitando assim contaminações acidentais antes e após as exposições ao plasma.

Figuras 12. Monitor biológico A (MB-A) inserido no interior de placas de Petri de alumínio.

Figuras 13. Monitor biológico B (MB-B) inserido no interior de placas de Petri de alumínio.

4.2.7 Tentativa de validação do método de recuperação dos esporos inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos utilizando filtração esterilizante

Imediatamente após obtidos os primeiros monitores biológicos, os mesmos foram utilizados para a validação da técnica de recuperação dos esporos a partir dos indicadores biológicos por filtração esterilizante (CHAN-MYERS *et al.*, 1997; CHU *et al.*, 1999; PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000)

A metodologia utilizada consistiu na retirada de três lamínulas de 8x18mm inoculadas (suportes) e alojadas no interior de distintos conectores de cada monitor biológico sob condições assépticas, seguindo-se seu contato com 50mL de água destilada contidos em três tubos distintos de 37mm x 200mm. Seguiu-se tempo de contato de 30min e posteriormente os tubos foram submetidos à agitação em Vortex, marca IKA®, modelo MS2 (IKA, Wilmington, NC, USA), ao qual se imprimiu 3000rpm por aproximadamente 2min. A seguir, os tubos foram submetidos a choque térmico (70°C por 15 min) e transferidos para capela de fluxo laminar, onde foi completado o volume dos tubos para 100mL com água destilada estéril. A seguir, o volume de cada um dos três

tubos foi subdividido em quatro alíquotas de 25mL e submetido à filtração em cada uma de quatro membranas esterilizantes de 47mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45µm, acopladas entre copo receptor e coletor Sterifil® (Millipore, Beldford, MA, USA). A passagem das alíquotas através da membrana esterilizante foi possibilitada por bomba de vácuo marca Millipore®, modelo WP 6111560, com capacidade de vácuo de 700mm Hg (Figura 8).

A seguir, cada uma das membranas foi retirada do sistema filtrante com auxílio de pinça e depositada em placa de Petri contendo cerca de 15mL de ágar caseína-soja estéril e solidificado por placa (Figura 9) . A incubação das placas foi na posição invertida em estufa a $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 24h, seguindo-se contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônias). Este procedimento foi repetido três vezes em três ocasiões distintas, tendo sido a contagem feita em triplicata de placas de Petri.

4.2.8 Validação do método de recuperação dos esporos inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos utilizando método dos tubos múltiplos ou NMP (número mais provável)

Após descongelamento, à temperatura ambiente, de mais uma alíquota de 10mL do *pool* de esporos padronizado conforme item 4.2.2, as operações de diluição foram feitas de modo a se obter nova suspensão contendo cerca de 10^3 esporos em 20µL. Procedeu-se o inóculo de novos indicadores biológicos com subsequente preparo de monitores biológicos conforme item 4.2.6, os quais foram armazenados à temperatura ambiente por 24h. Prosseguiu-se então a metodologia em duas etapas distintas, a seguir descritas.

A primeira etapa da validação utilizando o método dos tubos múltiplos ou NMP (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ed., 1998; PINTO *et al.*, 2003) consistiu na retirada de três suportes de 8x18mm inoculados e alojados individualmente no interior de conectores de cada um dos monitores biológicos sob condições assépticas, seguindo-se seu contato com 10mL de caldo

caseína soja (Difco, Detroit, MI, USA) estéril e cerca de 1g de perolas de vidro contidos em três tubos distintos de 20mm x 150mm. Posteriormente os tubos foram submetidos à agitação em Vortex, marca IKA®, modelo MS2 (IKA, Wilmington, NC, USA), ao qual se imprimiu 3.000rpm por aproximadamente 2min até fragmentação completa das lamínulas distintas. A seguir, os tubos foram submetidos a choque térmico (70°C por 15 min) e transferidos para capela de fluxo laminar, onde foram realizadas três diluições seriadas decimais, utilizando três réplicas de cinco tubos distintos contendo 9mL de caldo caseína soja, conforme Figura 14. Todos os tubos, juntamente com os tubos referentes ao controles negativos, foram incubados em estufa a ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 96h. Após o término da incubação, procedeu-se a leitura de cada conjunto de tubos referente aos monitores biológicos, sendo reportado o resultado positivo quando observada turvação e formação de película laranja característica de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372. Adicionalmente, foi considerado resultado negativo quando constatada ausência das características anteriormente citadas, ou seja, tubos contendo meio de cultura isento de turbidez ou película.

Figura 14. Esquema de diluições decimais seriadas do método de contagem microbiana por tubos múltiplos ou número mais provável (NMP).

A segunda etapa consistiu no inóculo direto de três alíquotas de 20 μ L contendo cerca de 10³ esporos em três tubos distintos de 20mm x 150mm contendo 10mL de caldo caseína soja estéril e cerca de 1g de perolas de vidro. Os tubos foram então submetidos às mesmas condições descritas acima para os tubos contendo os indicadores biológicos, sendo o esquema de diluições seriadas o mesmo mostrado na Figura 14.

Para proceder à determinação do número mais provável (NMP) de esporos presente nos suportes inoculados e nas alíquotas de 20 μ L, foi utilizada tabela estatística que se baseia em estimativa fundamentada em probabilidade (FARM. BRAS. 4^a ED., 1998; PINTO *et al.*, 2003), indicando o valor dentro de uma faixa que reflete o número mais provável de microrganismos presente.

4.2.9 Ciclos de exposição dos monitores biológicos ao plasma

Tendo em vista a continuidade da primeira etapa deste estudo, foi proposta avaliação da eficácia esterilizante sobre monitores biológicos preparados e inoculados conforme itens 4.2.5 e 4.2.6, respectivamente, abrangendo diferentes combinações de parâmetros para ambos os tipos de plasma propostos.

O primeiro dos sistemas contempla acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE), como mostra a Figura 15 a seguir apresentada.

Figura 15. Sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE).

Neste sistema, os monitores biológicos foram alocados no interior de placas de Petri constituídas em alumínio, as quais foram posicionadas e parafusadas sobre o eletrodo inferior do reator. A câmara do equipamento possui capacidade de 20L, bem como o sistema agrega dois eletrodos com 15,24cm de diâmetro cada, distanciados um do outro por 8cm e sendo os mesmos os responsáveis pela geração da descarga elétrica sobre o gás e formação do plasma. Ainda, ambos os eletrodos estão localizados em posições opostas, sendo um na base da câmara (ânodo) e o outro na tampa (cátodo), onde estão também os orifícios que permitem o acesso do gás precursor.

O carregamento das amostras foi feito sob pressão atmosférica (760Torr), umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$). Entretanto, o eletrodo sobre o qual foram colocadas foi refrigerado a cerca de 5°C por banho de etilenoglicol ajustado sob temperatura de cerca de -8°C a fim de manter a temperatura da câmara constante durante todo o processo de esterilização. A umidade relativa foi reduzida para $30 \pm 5\%$.

Após a alocação dos monitores biológicos no reator e fechamento da tampa, as etapas do processo iniciaram-se com redução da pressão até

0,02Torr através de sistema de vácuo composto de bomba mecânica rotativa e bomba de alta vazão tipo *roots*, compondo um sistema conhecido por *dry pump*.

Após a redução da pressão, foram injetados o gás ou mistura de gases de processo no interior do reator sob a vazão requerida até atingir a saturação da câmara, permanecendo os mesmos sob fluxo contínuo de entrada e saída. Após a injeção, foi regulada a pressão de trabalho para 0,1Torr, sendo que o plasma foi originado por meio de um gerador de rádio-freqüência (RF) que operou em 13,56MHz, o que permitiu controlar a potência requerida aplicada aos eletrodos. Transcorridos os tempos de processo (Quadros 1 e 2), interrompeu-se a geração de potência aos eletrodos, e acionou-se a válvula de vácuo da câmara a fim de reduzir novamente a pressão para 0,02Torr para evacuar a câmara (pressões de baixo vácuo). Finalmente, procedeu-se a elevação da pressão interna a níveis atmosféricos pela introdução do gás N₂, de forma a possibilitar a abertura da tampa do reator (Figura 16). Seguiu-se o fechamento manual da tampa da placa de Petri contendo os monitores biológicos A e B utilizando pinça estéril.

Figura 16. Desenho esquemático das variáveis de pressão aplicadas para os processos de plasma executados.

O segundo sistema contempla formação de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e segundo sistema de plasma utilizado pode ser considerado como um sistema híbrido sendo composto por uma bobina (sistema indutivo) localizada na tampa e um eletrodo (sistema capacitivo) acoplado na base do equipamento, ambos dispostos em sentido planar. Nesse arranjo, a potência de RF é aplicada em ambos eletrodo e bobina simultaneamente através de geradores distintos que operam em rádio-freqüência de 13,56MHz, resultando nas potências requeridas e promovendo a geração de plasma de alta densidade ao se aplicar potencial RF aos terminais dos dois dispositivos. Ainda, a configuração geral do equipamento é a mesma usada para o modo RIE, com exceção da tampa superior onde se localiza a bobina indutiva (Figura 17).

A colocação das amostras no reator, bem como as etapas do processo foram realizadas de forma similar ao sistema RIE, conforme citado anteriormente.

Figura 17. Sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP).

Para os dois sistemas de plasma, ambos os tipos de monitores biológicos A e B (MB-A e MB-B) foram submetidos a ciclos abrangendo diferentes combinações de parâmetros, que envolveram um tipo de gás e este em mistura (O_2 puro e $O_2 + H_2O_2$), responsáveis pela diversidade de entidades do plasma, duas potências de rádio-freqüência para o sistema RIE (100 e 150W), e duas potências de rádio-freqüência para o sistema ICP (200 e 300W), seis tempos de exposição e vazões distintas de gás. Todos os ciclos foram realizados em triplicata, onde se mantiveram constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), a umidade relativa ($30 \pm 5\%$) e a temperatura de processo (não superior a $60^\circ C$), monitoradas durante os ciclos, apontando-se limitações específicas e propostas corretivas ou alternativas aplicáveis.

Os parâmetros utilizados foram escolhidos com base em estudos prévios envolvendo letalidade e resistência de indicadores biológicos, expostos diretamente ao plasma, utilizando esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, realizados pela equipe de pesquisa do laboratório (MOREIRA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007), tendo sido definidos conforme Quadros 1 e 2 a seguir:

Parâmetros fixos			
Umidade relativa (%)	Temperatura (°C)		Pressão (Torr)
30 ± 5%	Inferior a 60°C		0,1 Torr
Amostras			
Monitores biológicos A e B (MB– A e MB– B) posicionados numa mesma placa			
Combinação de parâmetros			
O ₂ puro -100% (vazão: 200sccm)		O ₂ -80% + H ₂ O ₂ -20% (vazão: 160 + 40sccm)	
Potências de rádio-freqüência (W)			
100W	150W	100W	150W
Tempos de exposição sub-letais (min)			
20,40,60,80,100,120	5,10,15,20,25,30	5,10,15,20,25,30	5,10,15,20,25,30
Total de ciclos= 72			

Quadro 1. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição sub-letais dos monitores biológicos em sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* - RIE (triplicata de ciclos).

Parâmetros fixos			
Umidade relativa (%)	Temperatura (°C)		Pressão (Torr)
30 ± 5%	Inferior a 60°C		0,1 Torr
Amostras			
Monitores biológicos A e B (MB–A e MB– B) posicionados numa mesma placa			
Combinação de parâmetros			
O ₂ puro -100% (vazão: 200sccm)		O ₂ -80% + H ₂ O ₂ -20% (vazão: 160 + 40sccm)	
Potências de rádio-freqüência (W)			
200W 100(bobina)+100(eletrodo)	300W 200(bobina)+100(eletrodo)	200W 100(bobina)+100(eletrodo)	300W 200(bobina)+100(eletrodo)
Tempos de exposição sub-letais (min)			
20,40,60,80,100,120	5,10,15,20,25,30	5,10,15,20,25,30	5,10,15,20,25,30
Total de ciclos= 72			

Quadro 2. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição sub-letais dos monitores biológicos em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* – ICP (triplicata de ciclos).

Adicionalmente, para os ciclos envolvendo O₂ puro, a vazão do gás foi controlada por dispositivos denominados controladores de fluxos de massa (*mass flow controllers*), até que a câmara fosse saturada internamente.

Para os ciclos envolvendo a mistura de O₂ + H₂O₂, foi necessário promover a vaporização inicial do H₂O₂, aplicando-se vácuo no reservatório do mesmo (em sua forma líquida), acoplado à câmara do equipamento. Entretanto, para eliminar o efeito microbicida intrínseco do H₂O₂, a potência de RF foi imediatamente aplicada aos eletrodos assim que o H₂O₂ vaporizado atingiu o reator que continha as amostras, se misturando então ao gás O₂ e iniciando a fase de plasma.

Posteriormente, a vazão da mistura gasosa foi mensurada através de curva de calibração, tendo o O₂ como gás referência (fator de correção = 1), sendo que para cada vazão de O₂ aplicada foi obtida uma pressão

correspondente. A partir desses valores, foi realizada a conversão para o H_2O_2 , (fator de correção = 0,9), como mostram os dados da Tabela 2:

Tabela 2. Curva de calibração da vazão de H_2O_2 em função da pressão e vazão do O_2 no interior da câmara.

Pressão (mTorr)	Vazão de O_2 (sccm)	Vazão de H_2O_2 (sccm)
6,8	11	10
10,6	17	15
12,0	22	20
14,5	28	25
16,6	33	30
18,7	39	35
20,5	44	40
22,6	50	45
24,8	56	50
26,2	61	55
28,2	67	60
29,8	72	65
31,5	78	70
34,9	90	80
37,7	100	90
40,4	111	100

Legenda:

mTorr = militorr;

sccm = centímetros cúbicos padrão por minuto.

Além disso, para os ciclos envolvendo a mistura de $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$, foi imediatamente aplicada potência de RF sobre os eletrodos e bobina logo após inserida a mistura no sistema e atingido a saturação da câmara, de forma a eliminar o efeito microbicida inerente ao H_2O_2 .

4.2.10 Enumeração de esporos sobreviventes e acompanhamento da letalidade/resistência

Ao término de cada ciclo sub-letal de exposição ao plasma, ocorreu quebra do vácuo e lavagem da amostra com N₂ puro no momento da abertura da câmara, quando as placas de Petri constituídas em alumínio, contendo os monitores biológicos, foram imediatamente fechadas com ajuda de pinça estéril a fim de se evitar contaminação acidental. Cada amostra foi armazenada a temperatura ambiente por aproximadamente 24h.

Após decorrido o período citado, as amostras foram deslocadas para capela de fluxo laminar, removidas de suas embalagens e os sobreviventes quantificados utilizando metodologia descrita na validação da recuperação dos esporos inoculados em suportes inseridos no interior dos nos monitores biológicos utilizando método dos tubos múltiplos ou NMP, conforme item 4.2.8. Os números mais prováveis de esporos sobreviventes aos ciclos sub-letais foram determinados empregando-se Tabela descrita em literatura (PINTO *et al.*, 2003), sendo os dados obtidos destinados à obtenção de curvas de letalidade e cálculos dos respectivos valores D (MOISAN *et al.*, 2001; TALLENTIRE, 1977; USP 23, 1995; WEST, 1977).

4.2.11 Preparação das amostras de polímeros distintos

Como segunda etapa deste estudo, foi avaliada a compatibilidade do plasma com polímeros distintos, utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares, a saber: PVC, HDPE, PP, PUR e PC. Foram adquiridas, de produtores nacionais, chapas de 1mm de espessura, as quais foram cortadas em discos de 120mm de diâmetro, tendo sido posteriormente posicionadas em placas de Petri de alumínio, estas últimas confeccionadas para configurar o porta amostras.

4.2.12 Ciclos de exposição das amostras dos polímeros ao plasma

Tendo em vista o prosseguimento da segunda etapa do estudo envolvendo a compatibilidade do plasma com polímeros distintos, as chapas de 120mm de PVC, HDPE, PP, PUR e PC foram também submetidos a ciclos abrangendo ambos os sistemas de geração de plasma sob diferentes combinações de parâmetros, conforme Quadros 3 e 4 a seguir:

Parâmetros fixos				
Umidade relativa	Temperatura	Pressão	Tempo de exposição	Potência de RF
30 ± 5%	Inferior a 60 ⁰ C	0,1Torr	30min	150W
Amostras (1mm de espessura e 120mm de diâmetro)				
chapas de PVC	chapas de HDPE	chapas de PP	chapas de PUR	chapas de PC
Combinação de parâmetros				
O ₂ puro -100% (vazão: 200sccm)		O ₂ -80% + H ₂ O ₂ -20% (vazão: 160 + 40sccm)		
Total de ciclos= 30				

Quadro 3. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição das amostras dos polímeros em sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* – RIE (triplicata de ciclos).

Parâmetros fixos				
Umidade relativa	Temperatura	Pressão	Tempo de exposição	Potência de RF
30 ± 5%	Inferior a 60 ⁰ C	0,1 Torr	30 min.	300W
Amostras (1mm de espessura e 120mm de diâmetro)				
chapas de PVC	chapas de HDPE	chapas de PP	chapas de PUR	Chapas de PC
Combinação de parâmetros				
O ₂ puro -100% (vazão: 200sccm)		O ₂ -80% + H ₂ O ₂ -20% (vazão: 160 + 40sccm)		
Total de ciclos= 30				

Quadro 4. Parâmetros utilizados para os ciclos de exposição das amostras dos polímeros em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* – ICP (triplicata de ciclos).

A execução dos ciclos de 30min utilizando ambos sistemas de plasma respeitou sistemática idêntica à descrita no item 4.2.9, sendo que a triplicata de exposições para cada condição foi necessária a fim de gerar amostras em número suficiente para serem submetidas aos métodos analíticos de avaliação da compatibilidade dos polímeros distintos com o processo empregando plasma.

Ao término de cada ciclo de 30min de exposição, ocorreu quebra do vácuo e lavagem da amostra com N₂ puro no momento da abertura da câmara, momento no qual a placa de Petri de alumínio contendo a chapa foi imediatamente fechada com ajuda de pinça estéril a fim de se evitar contaminação acidental. Cada amostra foi armazenada a temperatura ambiente por aproximadamente 24h.

Após decorrido o período citado, cada amostra foi deslocada para capela de fluxo laminar, removida de sua embalagem e reposicionada em outra placa de Petri constituída em vidro, estéril. A fragmentação das amostras, posteriormente à execução dos ciclos foi feita de modo adequado, respeitando requisito necessário para análises envolvendo PAS-FTIR e microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliação de superfície, perfilometria para avaliação de rugosidade de superfície, microanálise para identificação semi-quantitativa de elementos químicos e difusão em ágar para avaliação de citotoxicidade.

4.2.13 Avaliação da compatibilidade das amostras dos polímeros com o processo esterilizante por plasma

4.2.13.1 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)

A análise das amostras por espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de *Fourier* foi realizada no laboratório de espectroscopia molecular do Instituto de Química da USP, utilizando o

equipamento BOMEM modelo DA 3.16, equipado com acessório fotoacústico da MTEC modelo 200.

As vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco amostras não expostas) foram cortadas de forma a preencher todo o fundo do porta amostras (célula fotoacústica), em fragmentos de aproximadamente 2 x 2 mm, tendo sido posteriormente posicionados no interior da cela fotoacústica. A seguir, imprimiu-se fluxo de gás He por cerca de dois min no interior da cela a fim de remover as moléculas de vapor de água e CO₂, bem como proporcionar atmosfera de He à amostra. Após a selagem, fez-se vácuo e iniciou-se cada varredura, inicialmente de um compósito de carvão ativo e borracha, que foi utilizado como referência para calibrar o equipamento, a seguir de cada amostra, tendo sido os dados armazenados no programa computacional BOMEM PCDA.

Os espectros das amostras foram obtidos de acordo com os seguintes parâmetros estabelecidos:

- Amplificador: ganho 4;
- Resolução: 4 cm⁻¹;
- Profundidade de penetração da radiação infravermelha (IV): cerca de 10µm;
- Número de varreduras: 64;
- Apodização: *hamming*;
- Faixa espectral: 400-4.000 cm⁻¹ (número de ondas);
- Abertura: 10 mm;
- Velocidade do espelho móvel: 0,05cm⁻¹.

4.2.13.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Foi realizada observação microscópica e fotográfica das amostras, de modo a permitir informações sobre possíveis alterações morfológicas na superfície dos polímeros avaliados.

A análise foi realizada no Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da USP, onde o equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de Varredura (SEM) JEOL 6460LV, Figura 18, tendo sido os dados armazenados em programa computacional inerente ao equipamento (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

Figura 18. Microscópio eletrônico de varredura (SEM) JEOL 6460LV.

As vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco amostras não expostas) foram cortadas em fragmentos irregulares de aproximadamente 1 x 1cm e posicionadas simultaneamente sobre o porta-amostra, o qual foi colocado no interior do equipamento logo abaixo da coluna de vácuo, como mostram as Figuras 19 e 20.

Figura 19. Distintos polímeros fragmentados em tamanhos irregulares de cerca de 1mm x 1mm posicionados sobre o porta-amostra (vinte e cinco fragmentos).

Figura 20. Desenho esquemático da coluna de alto vácuo do microscópio eletrônico de varredura (SEM) JEOL 6460LV.

Após o compartimento da coluna ter sido fechado, o procedimento de aplicação de corrente, aceleração dos elétrons por diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo utilizando filamento de tungstênio e a varredura do feixe sobre as amostras foi iniciado, utilizando os comandos do sistema computacional inerente ao equipamento, tendo sido ajustados os seguintes parâmetros:

- Aumento: de 1.000 a 37.000 vezes (variável para cada foto);
- Profundidade de incidência do feixe de elétrons: 0,5 μ m;
- Perímetro da varredura: 10 μ m;
- Diferença de potencial aplicado: 12keV;
- Detector: elétrons retroespalhados.

Adicionalmente, o feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas, as quais são as responsáveis pela varredura do feixe de elétrons sobre a amostra (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

4.2.13.3 Perfilometria

A avaliação da rugosidade de uma superfície pode ser realizada por várias técnicas, dentre elas a perfilometria, que utiliza o contato mecânico (físico) de um sensor com a mesma, e desta forma, o desvio vertical deste sensor é medido em função da sua posição horizontal, podendo-se obter imagens bi-dimensionais e tri-dimensionais. Assim, é possível avaliar os valores de altura dos vários degraus (VERDONCK, 1998).

A análise das amostras por perfilometria foi realizada no laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da USP, utilizando o equipamento perfilômetro DEKTAK 3030 (*Sloan Technology Corporation*).

As vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco amostras não expostas) foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5cm, tendo sido estes posicionados no interior do porta-amostra, sob as lentes de aumento. Foi utilizada agulha dotada de ponta de 25 μ m de diâmetro, portanto 12,5 μ m de raio de curvatura da ponta (r), extensão da varredura de 1mm e força da agulha de 0,2N.

Cada fragmento foi posicionado de forma a permanecer em ângulo de 90° em relação à agulha (sensor). O procedimento iniciou-se com o ajuste do equipamento para medir rugosidade de material desconhecido. A seguir, avançou-se a agulha verticalmente à amostra até que esta fosse tocada e acionou-se o comando para a realização da varredura de 1mm. Ao final da varredura, a agulha separou-se automaticamente da amostra, retrocedendo a sua posição inicial.

Os valores obtidos para a rugosidade da amostra representam a relação entre a altura medida (h) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira (y), como mostra a Figura 21 (VERDONCK, 1998).

Figura 21. Relação entre a altura medida (h) e a distância entre o ponto mais baixo da ponta da agulha e o degrau da trincheira (y).

4.2.13.4 Microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS)

Outro recurso fornecido pelo microscópio eletrônico de Varredura (SEM) JEOL 6460LV é o sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS), Figura 18, através do qual foi possível a realização da identificação semi-quantitativa de elementos químicos de amostras.

As vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco amostras não expostas) foram cortadas em fragmentos irregulares de aproximadamente 1 x 1cm, submetidas à deposição de ouro por tempo de 1 minuto em sistema de *sputtering* Edwards DC e posicionadas simultaneamente sobre o porta-amostra, o qual foi colocado no interior do equipamento logo abaixo da coluna de vácuo, como mostram as Figuras 19 e 20.

O equipamento foi operado de modo similar à obtenção das fotomicrografias, utilizando programa computacional distinto do usado no item 4.2.13.2. Os parâmetros adotados encontram-se descritos abaixo:

- Profundidade de incidência do feixe de elétrons: 0,5µm;
- Perímetro da varredura: 500µm;
- Diferença de potencial aplicado: 15keV;
- Detector: elétrons retroespalhados.

4.2.13.5 Citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em ágar

As avaliações *in vitro* foram feitas pela análise de citotoxicidade em culturas celulares, tomando como parâmetro a viabilidade celular, e utilizando o método de difusão em ágar.

Cultura celular

Os ensaios foram realizados na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL), tendo sido utilizada a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), células de tecido conjuntivo de camundongo, sendo que todo o trabalho foi desenvolvido empregando material estéril, bem como técnicas assépticas.

O cultivo e a manutenção da linhagem foram feitos em meio mínimo de Eagle (MEM), o qual foi preparado e suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 1,0mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM c/ 10% SFB) a 36°C, em garrafas de 75cm² ou 250mL com repiques a intervalos médios de 72h. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02% (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas no seu respectivo meio de cultura e distribuídas, tanto nas garrafas destinadas a manutenção como em placas de Petri utilizadas durante a realização dos ensaios (FRESHNEY, 1987; CRUZ, 2003; AZEVEDO, 2004).

Método de difusão em ágar

As células foram semeadas em volumes de 5mL em placas de Petri (60x15 mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL. A incubação foi realizada por 48h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, com a monocamada de células já formadas, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 5mL de meio *overlay*, em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (BBL-Becton Dickinson) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck), como corante vital. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado com o MEM duas vezes concentrado, ambos à temperatura de $44 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a execução da avaliação das chapas de polímeros em PVC, HDPE, PP, PUR, PC, as vinte e cinco chapas (vinte amostras expostas e cinco amostras não expostas) foram fragmentadas com bisturi estéril em tamanhos

aproximados de 0,5cm x 0,5cm e foram depositadas sobre a camada de ágar, antes de sua solidificação completa. As placas de Petri distintas (60x15 mm) foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h (GUESS *et al.*, 1965; ISO, 1999; USP 29, 2006).

As amostras foram avaliadas em triplicata, sendo que como controles positivos foram utilizados fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro, respeitando a dimensão de 0,5cm de diâmetro para ambos.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da amostra testada. Estes halos, quando presentes foram cuidadosamente medidos empregando paquímetro calibrado.

A graduação da citotoxicidade foi realizada conforme a orientação da USP 29ª edição (USP 29, 2006), sendo consideradas tóxicas, para polímeros, as amostras que apresentarem IZ > 2. A farmacopéia descreve ainda os diferentes índices de zona (IZ), a saber:

- IZ=0: ausência de efeito sob a amostra;
- IZ=1: alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra;
- IZ=2: halo claro limitado somente sob a amostra;
- IZ=3: halo entre 0,5 e 1,0cm ao redor da amostra;
- IZ=4: halo claro maior que 1,0cm ao redor da amostra.

A fotomicrografia foi realizada em microscópio óptico marca ZEISS modelo Axioskop, com máquina fotográfica acoplada e filme Kodacolor (Kodac) 100 ASA.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção dos monitores biológicos para processo esterilizante por plasma

Os dados obtidos durante o acompanhamento do processo de esporulação do microrganismo *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 nos 4 grupos de garrafas de Roux estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

A obtenção dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 foi realizada em meio sólido, tendo fornecido rendimento satisfatório com relação aos valores percentuais de esporulação, os quais atingiram índice de 90% a 95% de esporulação em todas as garrafas, quando do 12º dia de incubação. (OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA & PINTO, 2001; OLIVEIRA & PINTO, 2002; PINTO, 1991; PINTO & OLIVEIRA, 2001; PINTO & SAITO, 1992).

Os resultados referentes à padronização do número de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 do *pool* obtido a partir dos grupos de garrafas G1, G2, G3 e G4 estão descritos na Tabela 5.

A obtenção de resultado homogêneo em todos os quatro grupos de garrafas descritos anteriormente estimulou que as suspensões de esporos lavados fossem acondicionadas em um único frasco, obtendo-se o *pool* de esporos, tendo sido posteriormente submetido à padronização através da metodologia de semeadura em profundidade ou *Pour plate* (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ED., 1998; PINTO *et al.*, 2003), tendo sido obtido valor médio representativo de $1,81 \times 10^9$ UFC/mL.

Distintas alíquotas (20 a 100µL) contendo cerca de 10^3 esporos inoculados em lamínulas de 8 x 18mm foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura. As Figuras 22 e 23 representam a microscopia eletrônica de varredura da alíquota de 20µL com 10^3 esporos, inoculada em suportes vítreos de 8 x 18mm, sob aumento de 1.420 e 5.700 vezes, respectivamente.

Desta forma, pôde-se evidenciar ausência de sobreposição celular significativa em todas as alíquotas testadas.

Tabela 5. Padronização do número de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 no *pool* obtido a partir dos grupos de garrafas G1, G2, G3 e G4.

Plaqueamento	Triplicata	Fator de diluição			Contagem média UFC/mL (dil 10 ⁻⁷)
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
I	1	117	10	1	1,17 x 10 ⁹
	2	155	18	1	1,55 x 10 ⁹
	3	126	14	1	1,26 x 10 ⁹
II	1	271	21	2	2,71 x 10 ⁹
	2	318	34	3	3,18 x 10 ⁹
	3	289	25	2	2,89 x 10 ⁹
III	1	107	10	1	1,07 x 10 ⁹
	2	133	15	1	1,33 x 10 ⁹
	3	111	11	2	1,11 x 10 ⁹
Média					1,81 x 10⁹

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura da alíquota de 20μL com cerca de 10³ esporos inoculada em suportes vítreos de 8 x 18mm sob aumento de 1.420 vezes.

Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura da alíquota de 20μL com cerca de 10^3 esporos inoculada em suportes vítreos de 8 x 18mm sob aumento de 5.700 vezes.

5.2 Validação do método de recuperação dos esporos sobreviventes ao processo esterilizante por plasma

Os valores de contagem, utilizando técnica de filtração esterilizante, de cerca de 10^3 esporos/20μL de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados em solução aquosa encontram-se descritos na Tabela 6.

Foram obtidos valores de recuperação médios de 90%, quando o inóculo de cerca de 10^3 esporos em alíquota de 20μL foi feito primeiramente em solução, portanto acima dos valores mínimos exigidos por compêndios oficiais (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ed., 1998).

Os valores de contagem, utilizando técnica de filtração esterilizante, de cerca de 10^3 esporos/20μL de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos encontram-se descritos na Tabela 7.

Esses testes foram realizados nas mesmas condições citadas anteriormente, evidenciando resultados de recuperação satisfatórios, onde o valor médio de recuperação foi de 79,94% (cerca de 80%), ficando acima dos 70% preconizados nos compêndios oficiais (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ed., 1998) e coerente com os valores encontrados por Chan-Myers e colaboradores (1997), bem como por Chu e colaboradores (1999).

Os valores de contagem, utilizando técnica dos tubos múltiplos ou número mais provável (NMP), de cerca de 10^3 esporos/20 μ L de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados diretamente em 10mL de caldo caseína soja e em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos encontram-se descritos na Tabela 8.

Tendo sido necessário proceder à execução do método dos tubos múltiplos, os números obtidos na nova validação da recuperação dos esporos confirmam a alta sensibilidade do método, tendo sido recuperado número equivalente de células, tanto para alíquotas de 20 μ L contendo cerca de 10^3 esporos inoculados diretamente em caldo caseína-soja, quanto para indicadores biológicos contendo esporos secos e armazenados à temperatura ambiente por tempo de 48h, quando a estes também foi permitido o contato com o mesmo meio de cultura sob idênticas condições e evidenciando 100% de recuperação das células inoculadas.

Tabela 6. Valores de contagem, utilizando técnica de filtração esterilizante, de cerca de 10^3 esporos/20 μ L de *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372 inoculados em solução aquosa.

Plaqueamento	Triplicata	Membrana				Total de células	% de recuperação
		1	2	3	4		
I	1	237	220	243	270	970	97
	2	212	235	223	210	880	88
	3	203	195	209	183	800	80
II	1	251	259	240	240	990	99
	2	238	222	216	275	951	95
	3	208	232	240	194	874	87
III	1	206	199	215	231	851	85
	2	219	227	235	219	900	90
	3	208	243	203	219	873	87
Média						90	

Tabela 7. Valores de contagem, utilizando técnica de filtração esterilizante, de cerca de 10^3 esporos/20 μ L de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos.

Plaqueamento	Triplicata	Membrana				Total de células	% de recuperação
		1	2	3	4		
I	1	183	195	201	189	768	76,8
	2	199	205	190	187	781	78,1
	3	174	169	179	188	710	71,0
II	1	212	203	209	216	840	84,0
	2	220	207	198	205	830	83,0
	3	218	217	205	222	862	86,2
III	1	203	196	201	190	790	79,0
	2	189	206	209	200	804	80,4
	3	197	190	209	214	810	81,0
Média						79,94	

Tabela 8. Valores de contagem, utilizando técnica dos tubos múltiplos ou número mais provável (NMP), de cerca de 10^3 esporos/20 μ L de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados diretamente em 10mL de caldo caseína-soja e em suportes inseridos no interior dos monitores biológicos.

Amostra inoculada	Triplicata de análises	Número de tubos positivos (série de 5 tubos)			NMP de esporos	Limite inferior	Limite superior	Média do NMP de esporos
		Diluição	Diluição	Diluição				
		1:100	1:1.000	1:10.000				
Suporte	I	5	5	3	920	210	3.000	920
	II	5	5	3	920	210	3.000	
	III	5	5	3	920	210	3.000	
Alíquota de 20 μ L	I	5	5	3	920	210	3.000	920
	II	5	5	3	920	210	3.000	
	III	5	5	3	920	210	3.000	

Legenda:

NMP = número mais provável

5.3 Eficácia do processo de esterilização por plasma

5.3.1 Recuperação de esporos sobreviventes

Os valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB-A e MB-B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após desafios em ciclos sub-letais por distintos tipos de plasma obtidos em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching (RIE)*, potências de rádio frequência de 100 e 150W, distintas vazões de gás, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60⁰C encontram-se descritos nas Tabelas 9 a 12.

Os valores de recuperação (triplicata) dos esporos inoculados nos monitores biológicos A e B (MB-A e MB-B) em unidades formadoras de colônias (UFC) após a realização dos ciclos sub-letais por distintos tipos de

plasma obtidos em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP), potências de rádio frequência de 100W na bobina + 100W no eletrodo e 200W na bobina + 100W no eletrodo, distintas vazões de gás, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60⁰C encontram-se descritos nas Tabelas 13 a 16.

A execução da técnica analítica do número mais provável (NMP), sempre sob condições padronizadas e pelo mesmo analista, confirma a reprodutibilidade dos resultados encontrados para todas as triplicatas realizadas, os quais posteriormente foram utilizados para a construção das curvas de letalidade, possibilitando o estudo da eficácia esterilizante de ambos sistemas de plasma.

5.3.2 Curvas de letalidade microbiana

As Figuras 24 a 31 representam as curvas de letalidade de ambos monitores biológicos submetidos a ciclos sub-letais por distintos tipos de plasma obtidos em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching (RIE)* e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potências de rádio-freqüência de 100 e 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

As Figuras 32 a 39 representam as curvas de letalidade de ambos monitores biológicos submetidos a ciclos sub-letais por distintos tipos de plasma obtidos em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma (ICP)* e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potências de rádio freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo e 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Para cada triplicata de amostras foi obtida a média do número mais provável de sobreviventes e seu respectivo logaritmo, bem como foi construída a curva de letalidade microbiana e calculado o respectivo valor D. O valor de R^2 representa o coeficiente de correlação que varia entre 0 e 1, indicando o nível de correlação entre os pontos e a reta de melhor ajuste, ou seja, quanto mais próximo de 1, melhor é o coeficiente de correlação.

Figura 24. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-frequência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 25. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-frequência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 26. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 27. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 28. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 29. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 30. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 31. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio e peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 150W, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 32. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo planar modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 33. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 34. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 35. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio puro sob vazão de gás de 200sccm (100%), obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 36. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 37. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 100W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 38. Curva de letalidade do monitor biológico A (MB-A) de 7mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

Figura 39. Curva de letalidade do monitor biológico B (MB-B) de 1mm de diâmetro interno submetido a ciclos sub-letais por plasma de oxigênio + peróxido de hidrogênio sob vazões de gás de 160sccm (80%) e 40sccm (20%), respectivamente, obtido em sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP) e sob condições pré-estabelecidas de parâmetros, a saber: potência de rádio-freqüência de 200W na bobina + 100W no eletrodo, pressão de trabalho de 0,1Torr, umidade relativa de cerca de 30% e temperatura inferior a 60°C.

5.3.3 Valores D

Os valores de redução decimal (valor D), em min, de todas as variáveis estudadas para os sistemas de esterilização por plasma obtido com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE), sendo constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), umidade relativa (cerca de 30%) e temperatura (inferior a 60°C), encontram-se descritos na Tabela 17.

Os valores de redução decimal (valor D), em min, de todas as variáveis estudadas para os sistemas de esterilização por plasma de alta densidade obtido com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP), sendo constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), umidade relativa (cerca de 30%) e temperatura (inferior a 60°C), encontram-se descritos na Tabela 18.

A partir dos valores obtidos, foi possível avaliar (verificar) a influência dos calibres de ambos os monitores biológicos, das potências de rádio-freqüência aplicadas aos eletrodos e dos distintos gases utilizados em ambos os sistemas de plasma sobre a letalidade do microrganismo utilizado como sensor dos monitores biológicos utilizados nos desafios sub-letais, os esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372.

Tabela 17. Valores de redução decimal (valor D) em min de todas as variáveis estudadas para os sistemas de esterilização por plasma obtido com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE), sendo constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), umidade relativa (cerca de 30%) e temperatura (inferior a 60°C).

Monitor biológico (diâmetro interno) / gás(vazão de gás)/potência de rádio-freqüência	Valor D (min)
Monitor biológico A / O ₂ puro(200sccm-100%) / 100W	34,72
Monitor biológico B / O ₂ puro(200sccm-100%) / 100W	39,84
Monitor biológico A / O ₂ puro(200sccm-100%) / 150W	21,00
Monitor biológico B / O ₂ puro(200sccm-100%) / 150W	27,85
Monitor biológico A / O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/100W	9,24
Monitor biológico B / O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/100W	11,90
Monitor biológico A / O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/150W	8,23
Monitor biológico B / O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/150W	9,27

Tabela 18. Valores de redução decimal (valor D) em min de todas as variáveis estudadas para os sistemas de esterilização por plasma de alta densidade obtido com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP), sendo constantes a pressão de trabalho (0,1Torr), umidade relativa (cerca de 30%) e temperatura (inferior a 60°C).

Combinção de parâmetros Monitor biológico (diâmetro interno) /gás(vazão de gás)/potência de rádio-freqüência	Valor D (min)
Monitor biológico A/O ₂ puro(200sccm-100%)/100W na bobina+100W no eletrodo	19,34
Monitor biológico B/O ₂ puro(200sccm-100%)/100W na bobina+100W no eletrodo	25,90
Monitor biológico A/O ₂ puro(200sccm-100%)/200W na bobina+100W no eletrodo	18,21
Monitor biológico B/O ₂ puro(200sccm-100%)/200W na bobina+100W no eletrodo	22,12
Monitor biológico A/O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/100W na bobina + 100W no eletrodo	9,07
Monitor biológico B/O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/100W na bobina + 100W no eletrodo	9,89
Monitor biológico A/O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/200W na bobina + 100W no eletrodo	8,06
Monitor biológico B/O ₂ (160sccm-80%)+H ₂ O ₂ (40sccm-20%)/200W na bobina + 100W no eletrodo	8,96

5.4 Avaliação da compatibilidade das amostras dos polímeros com o processo de esterilização empregando plasma

5.4.1 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)

Os espectros de radiação infravermelha obtidos em equipamento BOMEM para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) estão descritos nas Figuras de 40 a 44 para cada polímero distinto e cinco combinações de parâmetros usadas.

Podem ser visualizados perfis sem alterações detectáveis, tendo em vista intensidades e deslocamento de bandas, entre as amostras não expostas e expostas para os cinco polímeros estudados (PVC, HDPE, PP, PUR e PC)

Assim, os resultados sugerem que ambos sistemas de plasma e gases não promoveram alterações internamente ao polímero (massa ou *bulk*) levando-se em conta a profundidade de cerca de 10µm atingida pela análise, suportando grande número de pesquisas que mostraram que o plasma atua nas primeiras camadas superficiais de polímeros (nm) e outros materiais (KLAPPERICH *et al.*, 2001; KACZMAREK *et al.*, 2002; AOUINTI *et al.*, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK *et al.*, 2006).

Figura 40. Espectros de radiação infravermelha obtidos para cinco amostras de PVC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂; RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂; ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂; ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂).

Figura 41. Espectros de radiação infravermelha obtidos para cinco amostras de HDPE (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂; RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂; ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂; ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂).

Figura 42. Espectros de radiação infravermelha obtidos para cinco amostras de PP (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂; RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂; ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂; ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂).

Figura 43. Espectros de radiação infravermelha obtidos para cinco amostras de PUR (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂; RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂; ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂; ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂).

Figura 44. Espectros de radiação infravermelha obtidos para cinco amostras de PC (uma não exposta e quatro expostas) sob quatro combinações de parâmetros (RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂; RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂; ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂; ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂).

5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol 6460L para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) estão descritos nas Figuras de 45 a 49, para cada polímero distinto e sob as combinações de parâmetros usadas.

As imagens evidenciam que, para todos os polímeros estudados, houve modificação das superfícies poliméricas, as quais apresentaram rugosidade superior comparados às superfícies não expostas ao processo. Ainda, a o aspecto visual das amostras aponta que aquelas expostas ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$ sofreram maior ataque das entidades reativas formadas durante o processo.

Figura 45. Fotomicrografias do PVC obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 37.000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) PVC não exposto; b) PVC exposto ao plasma em sistema RIE e gás O_2 ; c) PVC exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$; d) PVC exposto ao plasma em sistema ICP e gás O_2 ; e) PVC exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$.

Figura 46. Fotomicrografias do HDPE obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 5.000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) HDPE não exposto; b) HDPE exposto ao plasma em sistema RIE e gás O_2 ; c) HDPE exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$; d) HDPE exposto ao plasma em sistema ICP e gás O_2 ; e) HDPE exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$.

Figura 47. Fotomicrografias do PP obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 37000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) PP não exposto; b) PP exposto ao plasma em sistema RIE e gás O_2 ; c) PP exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$; d) PP exposto ao plasma em sistema ICP e gás O_2 ; e) PP exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$.

Figura 48. Fotomicrografias do PUR obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 37000 vezes {a} e 1.000 vezes {b, c, d, e}. a) PUR não exposto; b) PUR exposto ao plasma em sistema RIE e gás O₂; c) PUR exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa O₂ + H₂O₂; d) PUR exposto ao plasma em sistema ICP e gás O₂; e) PUR exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa O₂ + H₂O₂.

Figura 49. Fotomicrografias do PC obtidas por microscopia eletrônica de varredura em 1.000 vezes {a, b, c, d, e}. a) PC não exposto; b) PC exposto ao plasma em sistema RIE e gás O_2 ; c) PC exposto ao plasma em sistema RIE e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$; d) PC exposto ao plasma em sistema ICP e gás O_2 ; e) PC exposto ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$.

5.4.3 Perfilometria

Os resultados relativos à rugosidade média (Ra) em nanômetros e a rugosidade pico a pico (Rt) em nanômetros obtidos para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) estão descritos na Tabela 19 para as combinações de parâmetros usadas.

Os resultados numéricos compatibilizam com as fotomicrografias mostradas nas Figuras de 45 a 49, mostrando que, para todos os polímeros estudados, houve modificação da rugosidade média quando comparados às amostras não expostas ao processo.

Adicionalmente, foi interessante notar que aquelas expostas ao plasma em sistema ICP e mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$ apresentaram o maior valor, confirmando ataque mais intenso das entidades reativas formadas.

Tabela 19. Resultados relativos à rugosidade média (Ra) em nanômetros (nm) e a rugosidade pico a pico (Rt) em nm obtidos para as vinte e cinco amostras dos distintos polímeros (cinco não expostos e vinte expostos) para as combinações de parâmetros usadas.

POLÍMERO/condições		rugosidade(nm) média (Ra)	rugosidade(nm) pico a pico (Rt)
PVC	PVC não exposto	188	71
	PVC-RIE-O ₂	1236	1109
	PVC-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	1977	1623
	PVC-ICP-O ₂	1756	776
	PVC-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂	2883	959
HDPE	HDPE não exposto	4437	2277
	HDPE-RIE-O ₂	346	593
	HDPE-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	445	4640
	HDPE-ICP-O ₂	353	2256
	HDPE-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂	540	4048
PP	PP não exposto	1677	953
	PP-RIE-O ₂	1848	778
	PP-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	4052	810
	PP-ICP-O ₂	3017	951
	PP-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂	5087	2694
PUR	PUR não exposto	1546	1987
	PUR-RIE-O ₂	3069	606
	PUR-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	3325	985
	PUR-ICP-O ₂	3380	1650
	PUR-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂	5846	928
PC	PC não exposto	364	104
	PC-RIE-O ₂	2448	683
	PC-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	2612	527
	PC-ICP-O ₂	2581	1702
	PC-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂	2720	1525

Legenda:

RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂;
 RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂;
 ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂;
 ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂;
 PVC = poli(cloreto de vinila);
 HDPE = polietileno de alta densidade;
 PP = polipropileno;
 PUR = poliuretano;
 PC = policarbonato.

5.4.4 Microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS)

Os resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), tendo em vista a estrutura de cada polímero distinto (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP), através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L, estão apresentados nas Tabelas 20 a 24.

Os valores apresentados nas Tabelas 20 a 24 evidenciam aumento da razão O/C das chapas poliméricas expostas a todas as condições de plasma quando comparados às não expostas, tendo em vista todos os polímeros estudados, evidenciando a formação de novas ligações químicas envolvendo átomos de oxigênio por atuação das entidades reativas do plasma (O° , HO° , HO_2° e outros).

Em se considerando a influência de ambos os gases, O_2 puro e sua mistura utilizando H_2O_2 , verifica-se que o maior nível de oxidação foi devido à mistura $O_2 + H_2O_2$, para todos os polímeros expostos, e considerando ambos os sistemas de plasma

Ao se atentar detalhadamente para os resultados da razão O/C no presente estudo, evidencia-se suporte aos dados gerados pela SEM e perfilometria, onde os maiores graus de oxidação ocorreram a partir da exposição dos polímeros em sistema ICP, para ambos os gases.

Tabela 20. Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PVC através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).

Elemento químico	Combinações de parâmetros para o plasma (PVC)				
	PVC não exposto	PVC-RIE-O ₂	PVC-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	PVC-ICP-O ₂	PVC-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂
C	88,6	84,31	82,03	82,95	69,34
N	0	0	0	0	0,37
O	9,36	14,31	16,38	16,01	27,58
F	0	0,27	0	0	0
Na	0,25	0,28	0,31	0	0,41
Al	0,43	0,52	0	0,07	0,67
Si	0,22	0	0,14	0	0,32
Cl	1,14	0,22	1,05	1,04	1,17
K	0	0,1	0,08	0	0,14
Ti	0	0	0	0	0
Br	0	0	0	0	0
Sn	0	0	0	0	0
Ca	0	0	0	0	0
razão O/C	0,1	0,17	0,2	0,19	0,4

Legenda:

RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂;

RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂;

ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂;

ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂.

Tabela 21 Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o HDPE através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).

Elemento químico	Combinações de parâmetros para o plasma (HDPE)				
	HDPE não exposto	HDPE-RIE-O ₂	HDPE-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	HDPE-ICP-O ₂	HDPE-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂
C	92,8	71,35	65,38	67,6	62,65
N	3,43	0	0	0	0
O	2,22	26,05	33,4	32,1	37,35
F	0	0	0	0	0
Na	0,13	0,73	0,35	0	0
Al	0	0,72	0,48	0,3	0
Si	0,13	0	0	0	0
Cl	0,65	0,67	0,39	0	0
K	0	0	0	0	0
Ti	0	0	0	0	0
Br	0,63	0	0	0	0
Sn	0	0	0	0	0
Ca	0	0,48	0	0	0
razão O/C	0,02	0,36	0,51	0,47	0,6

Legenda:

RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂;

RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂;

ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂;

ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂.

Tabela 22. Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PP através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).

Elemento químico	Combinações de parâmetros para o plasma (PP)				
	PP não exposto	PP-RIE-O ₂	PP-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	PP-ICP-O ₂	PP-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂
C	91,77	76,08	74,16	75,72	71,05
N	0	0,65	0	0	0,13
O	7,03	20,55	25,5	23,85	26,47
F	0	0	0	0	0
Na	0,58	0	0,19	0	0,48
Al	0	0,76	0	0,43	0
Si	0,11	0	0	0	0,24
Cl	0	0,16	0,15	0	1,11
K	0,08	0	0	0	0
Ti	0	0,18	0	0	0,02
Br	0,43	0	0	0	0,51
Sn	0	1,6	0	0	0
Ca	0	0	0	0	0
razão O/C	0,08	0,27	0,34	0,31	0,37

Legenda:

RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂;

RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂; ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂;

ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂.

Tabela 23. Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PUR através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).

Elemento químico	Combinações de parâmetros para o plasma (PUR)				
	PUR não exposto	PUR-RIE-O ₂	PUR-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	PUR-ICP-O ₂	PUR-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂
C	78,56	76,15	61,63	71,79	58,46
N	3,67	4,31	13,12	6,6	7,55
O	16,62	18,81	22,86	20,4	32,66
F	0	0	0,49	0	0
Na	0	0,11	0,37	0,42	0,53
Al	0,09	0	0,47	0,28	0,08
Si	0,2	0	0	0	0
Cl	0,85	0,62	0,54	0,37	0,52
K	0	0	0	0,13	0,2
Ti	0	0	0	0	0
Br	0	0	0	0	0
Sn	0	0	0,46	0	0
Ca	0	0	0,07	0	0
razão O/C	0,21	0,24	0,37	0,28	0,56

Legenda:

RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂;

RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂;

ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂;

ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂.

Tabela 24. Resultados da avaliação semi-quantitativa dos elementos químicos e sua distribuição atômica em porcentagem (%), bem como a razão entre o elemento oxigênio e o elemento carbono (O/C), para o PC através de microanálise realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460L (não exposto e exposto sob diferentes combinações de parâmetros para ambos os sistemas de plasma (RIE e ICP)).

Elemento químico	Combinações de parâmetros para o plasma (PC)				
	PC não exposto	PC-RIE-O ₂	PC-RIE-O ₂ + H ₂ O ₂	PC-ICP-O ₂	PC-ICP-O ₂ + H ₂ O ₂
C	85,03	83,71	82,68	83,86	81,33
N	0	0	0	0	0
O	14,19	15,77	16,6	16	18,28
F	0	0	0	0	0
Na	0,19	0,19	0,18	0	0
Al	0,32	0,33	0,41	0	0,38
Si	0	0	0	0,14	0
Cl	0,17	0	0,13	0	0
K	0	0	0	0	0
Ti	0	0	0	0	0
Br	0	0	0	0	0
Sn	0	0	0	0	0
Ca	0,1	0	0	0	0
razão O/C	0,17	0,19	0,2	0,19	0,22

Legenda:

RIE-O₂ = plasma com acoplamento capacitivo usando gás O₂;

RIE-O₂ + H₂O₂ = Plasma com acoplamento capacitivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂;

ICP-O₂ = Plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando gás O₂;

ICP-O₂ + H₂O₂ = plasma de alta densidade com acoplamento indutivo usando mistura de gases O₂ e H₂O₂.

5.4.5 Citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em ágar

Todas as amostras de polímeros não expostos (cinco amostras) ou expostos a diferentes combinações de parâmetros do processo esterilizante por plasma (vinte amostras) não apresentaram halo claro limitado sob e/ou ao redor dos fragmentos de 0,5 x 0,5cm, indicando ausência de citotoxicidade *in vitro* para a linhagem celular NCTC clone 929, tendo sido graduadas com IZ=0, segundo a graduação da USP 29ª edição (USP 29, 2006).

Figura 50. Placas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizada no método de difusão em ágar, mostrando o halo claro ao redor do controle positivo (a) e ausência de halo ao redor ou sob o controle negativo (b).

Figura 51. Fotomicrografia do controle positivo (em 100 vezes), mostrando as monocamadas da linhagem celular NCTC clone 929 utilizada no método de difusão em ágar, apresentando as células coradas e as células claras e lisadas caracterizadas pela presença do efeito tóxico (não absorvem o corante vital).

6. DISCUSSÃO

6.1 Efetividade esterilizante do plasma

Crescentes avanços no desenvolvimento das ciências médicas têm sido vivenciados nos últimos anos. Em nível hospitalar, um dos grandes desafios esteve atrelado à busca pela execução de procedimentos cirúrgicos e terapias de caráter cada vez menos invasivo, buscando sempre aliar segurança e efetividade na execução de tais procedimentos.

O advento do emprego de produtos médico-hospitalares confeccionados em materiais poliméricos de natureza termossensível tem estimulado pesquisas e estudos na busca por inovações no âmbito da esterilização desses materiais.

Métodos largamente utilizados atualmente envolvem o uso de distintas tecnologias. Entretanto, o grande número de limitações envolvidas tem impulsionado sobremaneira a busca por alternativas eficazes e factíveis.

A utilização de gás óxido de etileno, tanto na forma pura quanto em misturas com gases inertes com conseqüente redução da sua inflamabilidade e explosividade (OLIVEIRA, 2000; PINTO *et al.*, 2002; OLIVEIRA & PINTO, 2002; PINTO, 2003), tem sofrido grandes mudanças provocadas por questões ocupacionais e ambientais (RUTALA *et al.*, 1996; DEN ELZEN *et al.*, 1992), ao mesmo tempo em que se faz necessário o atendimento a rígidas regulamentações (BRASIL, 1999; PINTO *et al.*, 2002; PINTO, 2003). Cita-se ainda, em nível nacional, legislação estabelecendo eliminação gradativa dos gases inertes, comprovadamente nocivos à camada de ozônio, em concordância com regulamentação internacional na qual fizeram parte vinte e quatro nações (BRASIL, 2000; MANZER, 1990).

Processos voltados para a utilização de radiação gama (SHINTANI, 1995), vapor de peróxido de hidrogênio e lavagens com formaldeído e glutaraldeído líquidos (RUSSEL, 1982) apresentam uma série de limitações, as quais vão desde custo de planta operacional e recursos de segurança necessários, modificações intrínsecas no material polimérico, até presença de

resíduos fortemente aderidos ao material processado e toxicidade intrínseca desses agentes.

A vasta gama de limitações inerentes à maioria dos métodos esterilizantes utilizados para processamento de produtos médico-hospitalares estimulou a procura por tecnologias alternativas, objetivando encontrar um agente esterilizante que apresente características ideais: efetividade, ausência de toxicidade intrínseca e ocupacional, tempo curto de processo, custo, termocompatibilidade e vasta abrangência. Neste sentido, o uso de tecnologias de esterilização por plasma tem apontado para resultados promissores.

Equipamentos comercialmente disponíveis como Sterrad J&J® (HERMELIN, 1998) e Plazlyte Abtox® (BRYCE *et al.*, 1997) têm sido empregados, entretanto, utilizam o plasma para detoxicação dos agentes ativos principais, peróxido de hidrogênio e ácido peracético, respectivamente.

Tecnologias utilizando o plasma como agente esterilizante principal ainda necessitam de amplo estudo a fim de que sejam esclarecidas questões acerca da validação de parâmetros, efetividade e aplicabilidade em vasta gama de produtos médico-hospitalares. Muitos estudos têm sido conduzidos nos últimos anos, porém os mesmos têm se apresentado por muitas vezes conflitantes ou mesmo inconsistentes, questões estas que muito provavelmente poderiam ser resolvidas com padronização de condições de processo e sua validação (WERNER, 1995).

Deste modo, esforços têm sido feitos no sentido de viabilizar o emprego dos chamados plasmas frios (MOISAN *et al.*, 2001), os quais podem potencialmente ser utilizados para o processamento de materiais termossensíveis, tanto em ambientes hospitalares quanto em plantas industriais produtoras desses itens.

Tendo em vista a intenção de abranger tais estudos, desenvolveu-se plano de trabalho acerca da aplicação de tecnologia de esterilização empregando plasmas frios verdadeiros. A busca de um delineamento experimental que atenda aos anseios de, com metodologia científica, estudar a complexa variedade de questões envolvendo o emprego do plasma como agente esterilizante, consiste em importante desafio.

Assim, uma das decisões foi desenvolver o cultivo do microrganismo escolhido e a preparação dos monitores biológicos em laboratório. Optou-se por proceder à obtenção dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, recentemente reclassificado como *Bacillus atrophaeus* (FRITZE & PUKALL, 2001) em meio sólido, o qual forneceu rendimento satisfatório com relação aos valores percentuais de esporulação (OLIVEIRA, 2000; OLIVEIRA & PINTO, 2001; OLIVEIRA & PINTO, 2002; PINTO, 1991; PINTO & OLIVEIRA, 2001; PINTO & SAITO, 1992). Estes resultados eram de certa forma esperados, tendo sempre atingido índice de 90% a 95% de esporulação em todas as garrafas, quando do 12º dia de incubação, como mostram os dados descritos nas Tabelas 3 e 4.

O resultado homogêneo obtido em todos os quatro grupos de garrafas (Tabelas 3 e 4) estimulou que fossem, sem segregações, agregadas todas as suspensões de esporos lavados em um único frasco, obtendo-se o *pool* de esporos. Posteriormente, adotando-se a metodologia de semeadura em profundidade ou *Pour plate* (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ED., 1998; PINTO *et al.*, 2003), foi realizada a padronização do *pool* de esporos, tendo sido obtido valor médio representativo de $1,81 \times 10^9$ UFC/mL (Tabela 5).

Em segunda instância, haveria que se considerar a escolha dos produtos médico-hospitalares que representassem adequadamente a abrangência de itens utilizados rotineiramente em hospitais, de forma a permitir estudo representativo e ao mesmo tempo exequível operacionalmente. Uma das grandes questões envolvendo o plasma é sua efetividade na esterilização de produtos médico-hospitalares de calibres reduzidos e longa extensão, uma vez que se sabe da dificuldade de acesso por parte das entidades reativas do plasma no *lumen* de tais peças (ALFA *et al.*, 1996; BÄR *et al.*, 2001; PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000; RUTALA *et al.*, 1999; RUTALA *et al.*, 1998).

Assim sendo, optou-se por trabalhar com três produtos médico-hospitalares de distintas extensões e calibres, sendo que foram escolhidas peças que pudessem ser fragmentadas e acopladas de forma estanque, conduzindo a obtenção de adequados monitores biológicos, ao mesmo tempo em que pudessem ser separadas para inclusão e exclusão dos suportes

inoculados com os microrganismos sensores do processo esterilizante por plasma. Os drenos torácicos 39FR (9mm de diâmetro interno) e 28FR (7mm de diâmetro interno), bem como os de 39FR e as sondas nasogástricas (1mm de diâmetro interno), acoplados entre si por borrachas de látex, foram as peças escolhidas dentre a gama de itens hospitalares disponíveis, todos provenientes de produtores nacionais. Em estudo comparativo entre esterilização por gás óxido de etileno e esterilização química líquida usando ácido peracético, foram empregados monitores biológicos semelhantes constituídos de catéteres em PVC de 3mm de diâmetro interno e 125cm de comprimento total e possuindo conector central de 2cm foi conectado bilateralmente por borrachas de látex (ALFA *et al.*, 1998).

A utilização da bomba de vácuo em uma das extremidades das peças já montadas foi necessária para comprovar a estanqueidade dos conjuntos, a fim de se eliminar a possibilidade de escape das entidades reativas do plasma através de junções imperfeitas. Este procedimento revelou monitores biológicos adequadamente acoplados e estanques.

Questões atreladas ao número de esporos que deveriam ser inoculados nos monitores biológicos foram baseadas em informações sobre a biocarga intrínseca presente em hospitais e em produtos médico-hospitalares utilizados e submetidos ao reprocessamento. Catéteres-guia reutilizados quatro vezes em unidades de saúde apresentaram biocarga em torno de 10^2 e 10^3 UFC/peça antes de serem submetidos ao processo esterilizante (SILVA, 2002). Penna e colaboradores mencionam valores em torno de 10^2 UFC para agulhas e 10^1 a 10^3 para catéteres e guias (PENNA *et al.*, 1999). Em outro estudo são relatados valores variando entre 10^1 e 10^4 para produtos médico-hospitalares rígidos e de calibre reduzido (CHAN-MYERS *et al.*, 1997), dados estes similares aos apresentados por CHU e colaboradores (1999), que citam valores de biocarga de instrumentos cirúrgicos ao redor de 10^2 e 10^3 por peça. Ainda, pesquisadores distintos são concordantes na avaliação de que, em média, os valores de biocarga de produtos medico-hospitalares após uso clínico situam-se em torno de 10^2 UFC por peça (CHU *et al.*, 1999; CHAN-MYERS *et al.*, 1997; RUTALA *et al.*, 1998).

Outro ponto importante que não se pode deixar de considerar é a dificuldade de acesso do agente esterilizante à parte interna dos monitores biológicos, razão pela qual, juntamente com os dados de biocarga em produtos médico-hospitalares após uso clínico, optou-se por inocular carga microbiana similar à biocarga hospitalar, ou seja, 10^3 esporos em cada monitor biológico, em detrimento de cargas ao redor de 10^6 a 10^7 inoculadas em experimentos convencionais de desafios ao agente esterilizante (HURY *et al.*, 1998; OLIVEIRA, 2000; PINTO *et al.*, 2002; OLIVEIRA & PINTO, 2002; SOLOSHENKO *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007).

Persistia ainda questão quanto à densidade das células inoculadas em determinadas alíquotas, uma vez que a sobreposição de células causa diferenças significativas na resistência dos esporos ao agente esterilizante, pois dificulta o acesso e o ataque da nuvem eletrônica à superfície celular dos esporos aglomerados (HURY *et al.*, 1998; SOLOSHENKO *et al.*, 2000). De acordo com Hury e colaboradores, a letalidade microbiana se apresentou superior quando se empregou inóculo de esporos em alíquotas de maior volume (10^7 células em 500 μ L), em detrimento de alíquotas de menor volume com o mesmo número de esporos (10^7 células em 50 μ L). Microscopia eletrônica de varredura de diferentes alíquotas (20 a 100 μ L) contendo cerca de 10^3 esporos inoculados em lamínulas de 8 x 18mm evidenciaram ausência de sobreposição celular significativa em todas as alíquotas testadas, como pode ser constatado nas Figuras 22 e 23, referentes à alíquota de menor volume, ou seja, 20 μ L.

Ao se definir quanto à escolha de metodologia de recuperação de esporos provenientes dos monitores biológicos submetidos aos ciclos esterilizantes, optou-se pelo emprego de filtração esterilizante (CHAN-MYERS *et al.*, 1997; CHU *et al.*, 1999; PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000), uma vez que o inóculo inicial não permitiria o uso adequado da técnica de semeadura em profundidade ou *Pour Plate* (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4^a ed., 1998; PINTO *et al.*, 2003), principalmente após redução do número inicial de células inoculado (cerca de 10^3 esporos por monitor biológico). A técnica de recuperação de células por filtração esterilizante sofreu

algumas adaptações a fim de otimizar e adequar o trabalho operacional, tendo apresentado valores de recuperação médios de 90%, quando o inóculo de cerca de 10^3 esporos em alíquota de 20uL foi feito primeiramente em solução, portanto acima dos valores mínimos exigidos por compêndios oficiais (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ed., 1998), como mostram os dados da Tabela 6.

Relatos em literatura apresentam o uso da tecnologia de filtração em membrana esterilizante de 0,45 μ m (PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000), entretanto não são mencionados dados de validação relativos à porcentagem de recuperação da carga microbiana inoculada.

Em continuidade aos experimentos, foi realizado inóculo da carga microbiana de cerca de 10^3 esporos na superfície interna ou *lumen* dos conectores dos monitores biológicos, seguindo idêntica técnica de recuperação citada anteriormente. Os resultados obtidos mostraram-se não consistentes, ou insatisfatórios, tendo sido a porcentagem de recuperação em torno de 40% (dados não apresentados), valores significativamente inferiores aos apresentados na validação da recuperação dos esporos a partir de solução aquosa (Tabela 6), bem como inferiores aos valores mínimos preconizados pelos compêndios oficiais (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4ª ed., 1998). Em estudos similares utilizando filtração esterilizante, valores de recuperação de células microbianas obtidos em experimentos de validação estiveram entre 85% (CHAN-MYERS *et al.*, 1997) e 83% (CHU *et al.*, 1999) quando inoculadas, respectivamente, em instrumentos cirúrgicos de aço inoxidável rígidos providos de *lumen* e instrumentos cirúrgicos de aço inoxidável desprovidos de *lumen*.

Com relação ao uso de superfícies poliméricas, dados de validação da recuperação, utilizando ambos métodos de filtração esterilizante e semeadura em profundidade ou *Pour plate*, de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados artificialmente em catéteres intravenosos mostraram valores médios de recuperação em torno de 42%, resultado esse que evidencia a dificuldade na detecção de células microbianas devido à agregação e

incrustação dos esporos na superfície polimérica ocorridas durante a secagem, levando à redução no número obtido de UFC (PINTO, 1995). Também a recuperação da carga microbiana natural ou *bioburden* de outras amostras de catéteres foi submetida à validação, tendo resultado em valores médios de 95%, sugerindo aderência celular típica de formação de biofilmes de bactérias vegetativas. Este tipo de aderência é mediada por interações hidrofóbicas fracas, e pode ter ocorrido neste caso, resultando em fraca adesão de bactérias vegetativas à superfície dos catéteres poliméricos utilizados, o que facilitou sua recuperação.

A dificuldade em se obter recuperação satisfatória de células a partir dos conectores dos monitores biológicos empregados no presente trabalho conduziu à decisão de se realizar o inóculo de 20uL em lamínulas de dimensão distinta, 8 x 18 mm, e posteriormente alojá-las internamente aos mesmos. Trabalho de Rutala e colaboradores (1998) cita aplicação de inóculo de 10µL contendo esporos em lâminas de aço inoxidável, as quais foram inseridas no interior de conectores do mesmo material, de 12mm de diâmetro interno, e a seguir conectados em prolongamentos bilaterais de 1, 2 e 3mm de diâmetro interno. Outros estudos abrangeram inóculo diretamente no interior de calibres reduzidos de produtos médico-hospitalares (PENNA *et al.*, 1999; PENNA & FERRAZ, 2000), porém valores percentuais de recuperação obtidos através de validação da técnica analítica não foram mencionados.

Prosseguiu-se com os experimentos realizando-se o inóculo da alíquota escolhida de 20uL contendo carga de cerca de 10^3 esporos em lamínulas de 8 x 18mm. Este volume foi considerado suficiente para permitir adequado espalhamento das células (Figuras 22 e 23), minimizando a formação de aglomerados e sobreposições indesejadas que pudessem interferir no acesso do agente esterilizante à superfície dos esporos, e ao mesmo tempo impedindo extravazamento do inóculo pelas bordas da lamínula. As novas dimensões da lamínula foram escolhidas de modo a permitir o alojamento das mesmas no interior dos fragmentos de drenos torácicos 39FR de 9 mm de diâmetro interno e 4cm de comprimento, escolhidos para constituir os conectores de ambos monitores biológicos.

Novos testes de recuperação das células inoculadas em suportes inseridos nos conectores dos monitores biológicos, realizados nas mesmas condições citadas anteriormente, evidenciaram resultados de recuperação satisfatórios, onde o valor médio de recuperação foi de 79,94% (cerca de 80%), como mostra a Tabela 7, ficando os valores percentuais acima dos 70% preconizados nos compêndios oficiais (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4^a ed., 1998) e coerente com os valores encontrados por Chan-Myers e colaboradores (1997), bem como por Chu e colaboradores (1999). É importante salientar que a validação foi executada imediatamente após o inóculo e secagem dos indicadores biológicos, sendo que o número excedente de suportes inoculados foi acondicionado individualmente em tubos poliméricos *ependorfs* de 2mL estéreis sob temperatura ambiente, a fim de serem posteriormente utilizados nos ciclos sub-letais por plasma.

Os resultados aparentavam satisfatórios, entretanto, à medida que se realizavam os ciclos sub-letais, suspeitou-se de recuperação insuficiente de esporos, o que levou a decisão de submeter algumas unidades armazenadas e não expostas à metodologia de filtração esterilizante recentemente validada. Exemplificando, constatou-se valores de recuperação insuficiente de células, entre 10 e 20% para as unidades testadas (valores não apresentados), ou seja, não foi obtida reprodutibilidade do percentual de recuperação anteriormente validado a partir dos indicadores biológicos recém inoculados e secos.

A explicação poderia estar atrelada na dificuldade das células armazenadas utilizarem-se dos nutrientes e água presentes no meio de cultura sólido, visto que seu contato com o meio de cultura é dificultado pela própria característica física do meio, assim como também pela barreira da membrana de celulose que pode ter limitado o acesso dos esporos ao meio de cultura e dificultado sua germinação. Adicionalmente, o uso de meio de cultura sólido fundido poderia se constituir em fator adicional de estresse, uma vez que a temperatura do meio, no momento da homogeneização da amostra, seria desfavorável à temperatura ótima de germinação e desenvolvimento das células (PINTO *et al.*, 2003).

Ainda, não se suspeitou de aglomeração de esporos e sua incrustação após período de secagem prolongado, uma vez que os mesmos foram inoculados em superfície vítrea e regular (Figuras 22 e 23), a despeito do inóculo em superfície polimérica irregular em trabalho anterior onde se obteve valores médios de recuperação ao redor de 42% (PINTO, 1995).

Desta maneira, optou-se pela tentativa de validação de nova técnica de recuperação dos esporos, dessa vez utilizando o método dos tubos múltiplos ou número mais provável (NMP) (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4^a ed., 1998; PINTO *et al.*, 2003). Trata-se de metodologia baseada em estimativa, fundamentada em probabilidade, indicando o valor, dentro de uma faixa, que reflete o número de células microbianas presente.

O método do número mais provável preconiza a realização de diluições seriadas das amostras inoculadas em meios de cultura líquidos (Figura 14), sendo os mesmos posteriormente incubados sob temperaturas ótimas de crescimento por período de 72 a 96h. Ao final do período de incubação, são obtidas leituras de número de tubos apresentando turbidez a partir de três ou de cinco réplicas de cada diluição. A obtenção do número mais provável de microrganismos ocorre com o auxílio de tabelas estatísticas específicas que correlacionam o número de diluições positivas e negativas para cada combinação de réplicas considerando os fatores de diluição aplicados. A utilização de cinco réplicas ao invés de três proporciona maior precisão de resultados (PINTO *et al.*, 2003), assim como é possível ajustar o modelo tradicional a maior número de réplicas através de programas computacionais (BRIONES JR & REICHARDT, 1999).

A metodologia apresenta como principal vantagem a alta sensibilidade, ou seja, permite melhor revitalização de células debilitadas em função do perfeito contato das mesmas com o meio de cultura líquido, favorecendo sua recuperação (PINTO *et al.*, 2003). Adicionalmente, permite a recuperação de microrganismos em situações onde se espera a presença de baixo número de células, situação essa compatível com a utilização de altas potências de rádio-freqüência para geração do plasma, planejadas para o presente trabalho.

Sun e colaboradores demonstraram a adequada aplicação da técnica no controle de qualidade de ambientes controlados de produção de medicamentos estéreis (salas limpas classe ISO 7), onde a contagem microbiana esperada é extremamente baixa. Neste estudo, foi proposto modelo matemático a fim de melhorar a precisão do método usando número limitado de amostras para estabelecer tendências (SUN *et al.*, 2006).

A utilização de meios nutritivos específicos e não específicos foi avaliada por Vivar e colaboradores no que tange à capacidade de recuperação de *Staphylococcus aureus* inoculados em medicamentos de uso oral (soluções e xaropes) usando a técnica do NMP para sua enumeração. Foram usados caldo caseína soja, caldo caseína soja com 10% de NaCl, caldo caseína soja com 0,2% de catalase, caldo manitol com NaCl e caldo telurito-manitol-glicina. A porcentagem de recuperação das células foi dependente do meio de cultura, tendo sido o caldo caseína soja o mais adequado, usado também no presente trabalho para recuperação do microrganismo sensor do processo (VIVAR *et al.*, 1993).

Estudo recente de Lourenço e colaboradores (LOURENÇO *et al.*, 2004) comparou ambos os métodos de contagem microbiana por filtração em membrana e estimativa dos tubos múltiplos (NMP) para proceder a determinação da biocarga de localizadores magnéticos. Valores entre 10 e 20% de recuperação encontrados na validação do método por filtração em membrana mostraram-se insuficientes e inferiores aos obtidos pelo método dos tubos múltiplos, com valores de recuperação entre 93,3 e 106,7%, revelando-se importante ferramenta na determinação da carga microbiana de produtos correlatos de natureza polimérica com interior metálico e conformação tubular.

Tem sido reportado que a utilização de técnicas convencionais na recuperação de bactérias heterotróficas presentes em fontes naturais de água resultam em baixos níveis de recuperação. Estudo realizado por Bussmann e colaboradores (2001) relata emprego e otimização da técnica de contagem por número mais provável (NMP), através da adição de substratos específicos e mudanças nas condições de incubação (atmosfera, tempo e temperatura). As alterações ocasionaram um aumento na capacidade de recuperação celular entre 11 e 18% para essa classe de bactérias, tendo sido ressaltada também a habilidade da metodologia em recuperar baixos números de células.

O uso da metodologia, agregando condições especiais (nutrientes, tempos e temperaturas de incubação, condições bioquímicas) tem sido utilizado satisfatoriamente para recuperação de microrganismos cuja recuperação seria insuficiente nas condições usuais, como por exemplo, a recuperação de bactérias do grupo clostrídios em certos alimentos (MEAD, 1992).

Na tentativa de otimizar o tempo de análise, a metodologia de NMP foi adaptada para o sistema de microplacas e comparada à contagem em placas convencional ou *Pour plate*. Os resultados coletados demonstraram que, embora o método tradicional seja mais preciso, o ganho em tempo foi substancial, o que torna o método adequado para enumeração de diferentes cepas microbianas provenientes de amostras de solo (SO *et al.*, 2000).

Para a condução de estudos epidemiológicos em hospitais, Carson e colaboradores (1975) também trabalharam com otimização da técnica do número mais provável para a recuperação de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando adição de asparagina e acetamida em caldos contendo fontes de carbono e nitrogênio. A metodologia foi avaliada levando em consideração a sensibilidade, seletividade e eficiência na recuperação de determinadas cepas presentes em ambiente hospitalar (água e fluidos biológicos), tendo sido verificada principalmente alta sensibilidade em recuperar baixos níveis do microrganismo nas amostras avaliadas (50UFC/mL), a despeito das dificuldades na aplicação da metodologia. Ainda, foi avaliada simultaneamente a técnica de recuperação celular utilizando filtração esterilizante, e para esta situação, contrariamente aos resultados obtidos no presente trabalho, a técnica analítica demonstrou resultados satisfatórios.

Ambas as técnicas otimizadas citadas acima foram posteriormente avaliadas por Eccles e colaboradores (2003), dessa vez tendo em vista a recuperação de *Escherichia coli* proveniente água de esgotos tratada, tendo sido, de maneira geral, obtida boa correlação entre as duas metodologias otimizadas estudadas, ou seja, taxas de recuperação equivalentes para amostras de água pós-tratamento.

Comparação entre os métodos de recuperação por número mais provável (NMP) e por semeadura em profundidade ou *Pour plate* foi realizado por Kaysner e colaboradores (1989), quando ambos foram utilizados na

recuperação do patógeno *Vibrio vulnificus* presente em ostras marinhas naturais da costa dos Estados Unidos. Nesta situação e utilizando meios seletivos para ambos os métodos, a técnica por NMP mostrou-se muito superior na recuperação dos microrganismos estressados por baixíssimas temperaturas de armazenamento das ostras (2°C), revelando número de microrganismos dez vezes superior ao número recuperado por plaqueamento direto.

Em trabalho de Suwansontchichai e colaboradores (2003) foram comparados métodos rápidos de detecção de *Escherichia coli* e coliformes, em camarões congelados, ao método de recuperação por número mais provável ou NMP, tendo sido comparadas à conveniência, custo, dias de incubação, grau de complexidade da análise, especificidade, sensibilidade e precisão entre todos os métodos. O método de NMP foi considerado o mais sensível e específico para ambas as classes de microrganismos, os quais encontravam-se debilitados pela baixa temperatura de conservação desses produtos, embora não tenha sido considerado o melhor método quando os outros itens foram avaliados. Assim sendo, fica clara a vantagem em se utilizar o método de NMP no que diz respeito à sensibilidade.

Também na recuperação de três cepas diferentes de *Listeria monocytogenes* intencionalmente inoculada em presunto cozido e submetida a condições de injúria celular (aquecimento à 56°C por 30 min e congelamento à -18°C por 14 dias) previamente ao seu inóculo, o método dos tubos múltiplos em réplicas de 5 tubos foi comparado ao plaqueamento direto e foi considerado mais sensível, principalmente quando o inóculo envolveu baixo número de células, cerca de $10^2/25g$ de amostra (YU *et al.*, 1993).

Tendo em vista o presente trabalho, os números obtidos na validação da recuperação dos esporos pelo método dos tubos múltiplos confirmam a alta sensibilidade do método, tendo sido recuperado número equivalente de células, tanto para alíquotas de 20µL contendo cerca de 10^3 esporos inoculados diretamente em caldo caseína-soja, quanto para indicadores biológicos contendo esporos secos e armazenados à temperatura ambiente por tempo de 48h, quando a estes também foi permitido o contato com o mesmo meio de cultura sob idênticas condições (Tabela 8). Estes valores mostraram 100% de

recuperação das células secas e armazenadas a partir de alíquotas padronizadas com cerca de 10^3 esporos por 20 μ L de água destilada, e portanto, a metodologia pode ser considerada validada para utilização na contagem de esporos sobreviventes aos ciclos sub-letais por gás plasma. Adicionalmente, quando os valores obtidos acima são comparados aos obtidos para o inóculo de idêntica alíquota utilizando técnica de semeadura em profundidade ou *Pour plate* (USP 23, 1995; USP 24, 2000; USP 25, 2002; USP 26, 2003; USP 27, 2004; USP 28, 2005; USP 29, 2006; FARM. BRAS. 4^a ed., 1998; PINTO *et al.*, 2003), que foi de 911 esporos, podendo ser considerado como controle positivo para o número real de células contidas na alíquota de 20 μ L, constata-se que a porcentagem de recuperação do método dos tubos múltiplos foi de 100,98%, confirmando portanto sua validação. Salienta-se que para obtenção de todos os valores citados foram utilizados indicadores biológicos secos e armazenados por cerca de 48h, seguindo-se idêntico critério de utilização para exposição dos mesmos aos ciclos sub-letais.

A execução da técnica analítica do número mais provável (NMP), realizada sempre sob condições padronizadas e pelo mesmo analista, confirma a reprodutibilidade dos resultados do número de esporos sobreviventes aos ciclos sub-letais por plasma encontrados para todas as triplicatas realizadas, como pode ser verificado nos valores mostrados nas Tabelas de 9 a 16.

Para os processos realizados neste estudo, optou-se por estabelecer alguns parâmetros fixos com base em estudos prévios do grupo de pesquisa (MOREIRA *et al.*, 2004), onde os experimentos usando fluxos de gás de 50, 100, 200 e 500sccm propiciaram sua comparação, tendo sido elucidado que o fluxo gás de 200sccm foi o mais efetivo na redução da carga microbiana, valor esse utilizado então para o presente trabalho e controlado constantemente por *mass flow controllers* durante todo o tempo de cada processo.

Provável explicação pode estar atrelada à magnitude desse aumento no fluxo de gás, onde maiores patamares podem levar a uma maior taxa de recombinação das entidades reativas dentro do reator, diminuindo sua efetividade sobre as amostras estudadas e podendo levar a um aumento da

interação das mesmas com as paredes do reator, eletrodos e outros componentes internos (MOREIRA *et al.*, 2004; LEROUGE *et al.*, 2001)

Lerouge e colaboradores (LEROUGE *et al.*, 2000c) trabalharam com exposição de *Bacillus subtilis* ATCC 9372 (Sporalex®) em plasma de O₂-CF₄ e constataram através de seus experimentos que aumentos no fluxo de gás (zero a 120sccm) elevaram a taxa de morte microbiana, com redução de cerca de 6,3 log em 5min. De acordo com Hayashi e colaboradores (2006), o fluxo de gás e também a pressão devem ser ajustados de modo a atingir uma taxa de colisão desprezível, propiciando então que as entidades reativas reajam com o material exposto.

Objetivando minimizar a ocorrência de efeitos indesejáveis com o aumento da temperatura, determinou-se a utilização de pressão de vácuo em 0,1Torr, valor esse que também influenciou maior letalidade microbiana se comparado à 0,333Torr em estudo anterior (MOREIRA *et al.*, 2004). Além disso, procurou-se manter a temperatura no interior do reator ao redor de 60°C durante o tempo de processo, o que foi possível graças ao uso de sistema de refrigeração sob o eletrodo onde estão localizadas as amostras. Em experimento de Lerouge e colaboradores, a pressão foi fixada em 0,08Torr (LEROUGE *et al.*, 2000c). Moisan e colaboradores descrevem que, comparando-se valores de baixa (0,001 a 0,01Torr), média (0,1 a 10Torr) e alta pressão de vácuo (760Torr ou 1atm), maiores tempos de esterilização relacionam-se com valores entre 0,001 e 0,01Torr devido à menor concentração espécies reativas (MOISAN *et al.*, 2001).

Em experimento visando esclarecer a distribuição e densidade das espécies reativas geradas em plasma de microondas empregando mistura O₂+N₂ e usando dois patamares distintos de pressão, 2Torr e 8Torr, houve maior incremento da densidade das espécies reativas sob 8Torr de pressão. Entretanto, esse padrão nem sempre foi mantido e apresentou variação à medida que variou também o fluxo da mistura gasosa no interior do reator (KUTASI *et al.*, 2006).

A temperatura desse sistema foi controlada ao redor de -5°C, impedindo o aquecimento excessivo do eletrodo e consequentemente das amostras, o que incompatibilizaria com o tratamento de materiais termossensíveis. Assim, a

intenção foi manter os níveis preconizados de temperatura, mesmo com o aumento progressivo das potências determinadas para este trabalho (100 a 300W), quando se esperava superaquecimento do sistema devido ao maior grau de agitação das entidades reativas formadas a partir da ativação do gás.

Em trabalho de revisão, Lerouge e colaboradores (LEROUGE *et al.*, 2001) relatam o aumento da potência de RF diretamente proporcional ao aumento da densidade eletrônica e da concentração das espécies reativas, com conseqüente aumento da atividade esporicida. Entretanto, estas condições são acompanhadas por aquecimento excessivo do gás e do material exposto, sendo necessário, portanto, o estabelecimento de patamar máximo para a aplicação da potência de RF e evitando fenômenos de superaquecimento.

Estudos acerca da taxa recombinação das espécies reativas mostrou que esse fenômeno depende também da natureza do material usado como porta amostras e pode provocar diferentes níveis de aquecimento do mesmo, interferindo no processo de letalidade microbiana. Foram testados alumínio e vidro, sendo que a taxa de recombinação para o alumínio foi maior, tendo sido maior também seu aquecimento, não ultrapassando 80°C (CVELBAR *et al.*, 2006). Justamente para minimizar tal efeito no presente estudo, foi acoplado sistema de resfriamento ao porta amostras confeccionado em alumínio.

O número de esporos sobreviventes obtidos após a realização dos ciclos sub-letais por plasma, utilizando dois sistemas de geração distintos, estão apresentados nas Tabelas de 9 a 12 (RIE) e 13 a 16 (ICP), sendo que esses dados possibilitaram a construção das curvas de letalidade mostradas nas Figuras de 24 a 31 (RIE) e 32 a 39 (ICP). A partir das curvas de letalidade, pôde-se matematicamente determinar o principal parâmetro de resistência, valor D (Tabelas 17-RIE e 18-ICP), do microrganismo utilizado como sensor dos processos e suas combinações de variáveis, os esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 (MOISAN *et al.*, 2001; TALLENTIRE, 1977; USP 23, 1995; WEST, 1977).

Analisando experimentos de diversos autores (HURY *et al.*, 1998; KELLY-WINTENBERG *et al.*, 1998; SOLOSHENKO *et al.*, 1999; SOLOSHENKO *et al.*, 2000; MOREAU *et al.*, 2000) observa-se a obtenção de curvas de letalidade com características distintas daquelas obtidas a partir de processos de esterilização

convencionais, fazendo pressupor que a cinética de morte microbiana relacionada aos processos de esterilização por plasma é diferente daquela observada para processos usualmente empregados.

Nos processos convencionais, o comportamento de letalidade de uma dada população microbiana homogênea é representado por linha reta descendente, nomeada curva de letalidade microbiana. Este único padrão descendente pode ser explicado pelo comportamento microbiano em questão frente ao agente esterilizante, onde se admite que se uma fração de células é destruída em um dado período de tempo, a mesma fração de células viáveis restantes seria destruída em tempo subsequente de igual duração, caracterizando então cinética de morte microbiana de primeira ordem (PADOVEZE & DEL MONTE, 2003).

Entretanto, experimentos realizados por Moisan e colaboradores sugerem que em processos empregando plasma verdadeiro pode-se observar diferenciação no padrão descendente da curva de letalidade microbiana, quando comparada à curva de primeira ordem de padrão descendente única obtida em processos de esterilização convencionais (MOISAN *et al.*, 2002).

Hury e colaboradores (1998) relatam curvas de letalidade notavelmente diferenciadas quando usando plasmas obtidos por tecnologia de microondas e utilizando Ar, O₂, CO₂ e H₂O₂ sob faixas reduzidas de pressão da ordem de 4mTorr e 600W de potência. A temperatura foi mantida em um máximo de 60°C através de sistema semelhante ao usado no presente trabalho. Os tempos sub-letais aplicados aos processos, quando utilizando como indicadores biológicos esporos de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus stearothermophilus*, possibilitaram a construção de curvas caracterizadas por dois distintos padrões de inclinação descendentes. Segundo os pesquisadores, provável explicação envolve mecanismo de inativação não linear caracterizados por duas velocidades distintas de inativação, ambas relacionadas com a densidade celular, ou seja, a distribuição dos esporos no suporte, causando diferença na adsorção direta e posterior difusão das entidades reativas do plasma entre as camadas de células, levando a taxas de letalidade com velocidades distintas.

Soloshenko e colaboradores (1999) obtiveram curvas de letalidade tri-fásicas, partindo de inóculo inicial de 10^7 esporos de *Bacillus subtilis* em placas de Petri e usando plasmas de ar ambiente, Ar, O₂, N₂, CO₂ e H₂. Posteriormente (SOLOSHENKO *et al.*, 2000), trabalharam com cargas de 10^5 a 10^8 esporos de *Bacillus subtilis* inoculados em placas de Petri expostas a plasma de O₂, ar ambiente e N₂. Em ambos experimentos concluíram que a radiação UV (160 a 220nm) teve papel primordial na inativação dos esporos aliada à presença de partículas ativas geradas principalmente a partir da ativação do gás O₂.

As curvas de letalidade obtidas por Kelly-Wintenberg e colaboradores (1998) mostrando dois distintos padrões de inclinação descendentes quando usando inóculo da ordem de 10^2 células de diferentes microrganismos, mencionam justificativa distinta de Hury e colaboradores (1998) mencionado anteriormente. Este comportamento particular é atribuído não às diferenças na densidade celular depositada no indicador biológico, mas sim à baixa concentração inicial de entidades reativas gerando alterações em nível superficial de membranas celulares: uma vez que a concentração de espécies reativas se torna suficiente para provocar letalidade, surge então uma segunda fase letal mais rápida e eficaz.

Moreau e colaboradores (2000) trabalharam com plasma gerado fora da descarga luminosa ou plasma *after-glow*, usando O₂ puro e O₂/Ar como gases precursores. Carga da ordem de 10^6 esporos de *Bacillus subtilis* foi depositada em receptáculos confeccionados em aço inoxidável de 10mm de diâmetro. Neste caso, a obtenção de curvas tri-fásicas com distintas inclinações descendentes é atribuída à ação conjunta de átomos de oxigênio e fótons ultravioleta emitidos por átomos e moléculas excitadas, principalmente na terceira fase das curvas, às quais são atribuídos os menores valores D.

Moisan e colaboradores sugerem alguns possíveis mecanismos que poderiam respaldar tais comportamentos das curvas de letalidade bi-fásicas e tri-fásicas, a saber: (a) destruição direta dos microrganismos por irradiação UV do material genético; (b) erosão dos microrganismos por fotodessorção intrínseca decorrente da radiação UV; (c) erosão direta ou *etching* dos

microorganismos, átomo a átomo, pelas entidades altamente reativas formadas no plasma (MOISAN *et al.*, 2001).

No presente estudo, a densidade celular e o número de células inoculadas (cerca de 10^3 esporos em alíquota de 20 μ L) foram ajustadas no sentido de minimizar a ocorrência de sobreposição celular, tentando viabilizar o acesso simultâneo das entidades reativas de ambos sistemas de plasma estudados a todas as células depositadas e secas. As curvas obtidas apresentaram padrão de letalidade caracterizando cinética de morte microbiana de primeira ordem, possibilitando os cálculos dos respectivos parâmetros de resistência dos monitores biológicos utilizados, os valores D (MOISAN *et al.*, 2001; TALLENTIRE, 1977; USP 23, 1995; WEST, 1977).

A obtenção de curvas descendentes caracterizando cinética de morte microbiana de primeira ordem foram obtidas também em experimento de Nagatsu e colaboradores (NAGATSU *et al.*, 2005), utilizando plasma de microondas, onde O₂, H₂ e Ar foram os gases precursores. Esses padrões foram obtidos mesmo com inóculo de alta carga de esporos de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 em disco de aço inoxidável. Resultados similares foram obtidos no uso de plasma de campo pulsátil utilizando ar ambiente como gás precursor (CHOI *et al.*, 2006).

Para os experimentos utilizando ambos os sistemas de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP), e mais precisamente no caso do plasma de O₂ puro, para ambas potências aplicadas nos dois sistemas é possível verificar maiores valores D (Tabelas 17 e 18) para os monitores biológicos B de 1mm de diâmetro interno (39,84min e 27,85min para RIE; 25,90min e 22,12min para ICP), quando comparados aos valores D dos monitores biológicos A de 7mm de diâmetro interno (34,72min e 21,00min para RIE; 19,34min e 18,21min para ICP), indicando maior resistência dos esporos quando inoculados nos monitores de menor calibre e pressupondo dificuldade de acesso das entidades reativas formadas no plasma ao seu interior. Este perfil de letalidade grandemente influenciada pelo calibre dos monitores também se repete quando se considera

o plasma da mistura de O₂ (80%) e H₂O₂ (20%) para ambos os sistemas RIE e ICP, conforme dados mostrados nas Tabelas 17 e 18.

Tentando simular um produto médico-hospitalar de difícil acesso, Hayashi e colaboradores trabalharam com indicadores biológicos comerciais (inóculo em frasco de polietileno acessível por orifício) embrulhados em tecido cirúrgico e por fim em sacos para esterilização. Os valores D para o *Bacillus subtilis* foram de 21min e 26min para exposição em plasma (radicais HO° e (O)) gerado por sistema ICP usando respectivamente, O₂ e vapor de água, sendo que o tempo requerido para destruição total dos microrganismos foi em média, 90 min, dentro das condições utilizadas no experimento (HAYASHI *et al.*, 2006).

A dificuldade imposta às entidades reativas parece interferir amplamente na resistência de esporos microbianos, uma vez que o patamar dos valores D obtidos são muito maiores do que aqueles obtidos em ampla gama de experimentos onde o microrganismo está diretamente exposto ao agente letal, o que poderia representar tempo total de esterilização de 2h ou mais dependendo da configuração do produto e levando-se em consideração também as características intrínsecas de cada uma das peças.

Neste mesmo trabalho (HAYASHI *et al.*, 2006), o papel da radiação UV foi considerado insignificante na ação microbida do plasma, uma vez que os microrganismos encontravam-se protegidos pelas embalagens que não permitiram seu acesso. No presente trabalho os esporos ficaram depositados interiormente aos cateteres, configurando os monitores biológicos, e portanto podem também não ter sofrido ação da radiação UV, ainda que essa questão não tenha sido objeto do presente estudo.

Em trabalho realizado por Rutala e colaboradores (1998), foi evidenciado decréscimo na habilidade do sistema de esterilização por plasma Sterrad 100® em eliminar a carga de *Bacillus stearothermophilus* inoculada na parte central de tubos rígidos de aço inoxidável de 40cm de comprimento proporcionalmente ao diâmetro interno dos mesmos, sendo que 5% das amostras falharam para os tubos de 3mm, 8% para os tubos de 2mm e 74% para os tubos de 1mm, embora tenha sido utilizado plasma não verdadeiro, assim como o método da fração negativa para avaliação da eficácia esterilizante.

Ainda para ambos plasmas de O_2 puro e $O_2 + H_2O_2$, quando considerando a questão das distintas potências de rádio-freqüência aplicadas, houve maior letalidade, ou seja, menores valores D, quando aplicada ao gerador potência de 150W para o sistema RIE e potência total de 300W para o sistema ICP, tanto para os monitores biológicos A quanto para os monitores biológicos B, indicando aumento da magnitude da densidade eletrônica e da geração de entidades reativas responsáveis pelo efeito letal do plasma (LEROUGE *et al.*, 2001) (Tabelas 17 e 18).

Soloshenko e colaboradores (1999) investigaram o tempo de esterilização de plasma de oxigênio em função da pressão do gás e da potência da descarga aplicada aos eletrodos de geração do plasma. Concluíram que o tempo total para esterilização de carga de 10^7 esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* inoculada em placas de Petri foi praticamente independente da primeira variável, mas grandemente influenciada pela segunda variável, com tempos menores de esterilização resultando de maiores potências aplicadas. Ressalta-se que neste caso em particular os microrganismos estavam totalmente expostos ao plasma de oxigênio, e não protegidos por peças dotadas de configuração tubular de calibre reduzido e longa extensão.

Ao se atentar para a magnitude dos valores D para os distintos gases, evidencia-se condição de maior letalidade, ou seja, menores valores D para a mistura gasosa de $O_2 + H_2O_2$, pressupondo potencialização do O_2 pelo H_2O_2 . Lerouge e colaboradores (LEROUGE *et al.*, 2000c) testaram distintas misturas gasosas para obtenção de plasma gerado em reator de microondas: O_2+Ar , O_2+H_2 , O_2+CF_4 . A eficácia das misturas foi comparada à do O_2 puro, e todas elas mostraram performance superior, ou seja, houve uma potencialização da atividade dos radicais gerados pela ativação do O_2 , sendo que a mistura de O_2+CF_4 forneceu inativação microbiana mais eficiente.

Estudo citado anteriormente de Soloshenko e colaboradores (SOLOSHENKO *et al.*, 1999) mostrou diferenças na efetividade esterilizante entre diferentes gases, tendo sido mais eficiente o plasma de O_2 puro, sendo seguido em ordem decrescente por ar ambiente, CO_2 , H_2 , Ar e N_2 quando utilizando carga de 10^7 esporos de *Bacillus subtilis* inoculados em placas de

Petri. Esse efeito teria sido provocado pela grande concentração das principais partículas ativas formadas, oxigênio atômico (O) e moléculas excitadas de oxigênio. Não houve utilização de nenhuma mistura gasosa com ou sem O₂.

Considerando ainda utilização de plasmas de gases puros, ao se comparar os dados obtidos por Khomich e colaboradores (KHOMICH *et al.*, 1998) coletados para o plasma de O₂ e plasmas de ar ambiente, CO₂, H₂, Ar e N₂, pôde-se observar maior eficiência para o plasma de O₂, tendo sido usada carga de 10⁷ esporos de *Bacillus subtilis* inoculados em placas de Petri de vidro de 10cm², sendo que a eficiência do plasma de O₂ foi de cinco a seis vezes maior do que para o plasma de ar ambiente. Ainda, os pesquisadores fornecem convincente evidência de que o principal fator envolvido na esterilização de esporos veiculados em suportes expostos são os raios ultra-violeta de comprimento de onda entre 160 e 240nm. Em contrapartida, para os tubos longos de calibre reduzido, uma vez que provavelmente o plasma não consegue percorrer a parte mais interna dos mesmos, são as partículas ativas eletricamente neutras as responsáveis pela magnitude do efeito letal do plasma de descarga elétrica direta ou *DC glow discharge*.

Usando plasma gerado em sistema ICP e empregando Ar, N₂, O₂ e vapor de água como gases precursores, Hayashi e colaboradores constataram que Ar e N₂ não tiveram qualquer efeito na letalidade dos esporos, enquanto que os dois últimos tiveram importante papel principalmente devido a geração de (O) e radicais HO^o (HAYASHI *et al.*, 2006).

Em experimento anterior (KHOMICH *et al.*, 1997), os pesquisadores usaram distintos microrganismos inoculados em placas de Petri de vidro de 10cm², a saber, esporos de *Bacillus subtilis* e formas vegetativas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O efeito letal do plasma (descarga elétrica direta ou *DC glow discharge*) de ar ambiente foi superior ao efeito do plasma de Ar e N₂, e para este caso a efetividade esterilizante foi devida a ação conjunta das partículas ativas eletricamente neutras e dos raios ultravioleta.

Trabalhando também com esporos depositados no interior de tubos de aço inoxidável (dimensões não mencionadas), Hury e colaboradores (1998) utilizaram plasma de Ar, O₂, CO₂, H₂O₂ e H₂O (vapor) gerados em reator de microondas. Ao comparar as curvas de sobrevivência, fica claro serem os

plasmas de H₂O₂ e CO₂ os que provocaram maior inativação dos esporos, sendo os átomos excitados de O₂, oxigênio atômico (O) e radicais contendo O₂ os grandes responsáveis por tal condição de letalidade.

Esterilização por plasma de H₂O₂ puro também foi estudada por Soloshenko e colaboradores (2002), tendo sido usada solução aquosa a 30% posteriormente evaporada no interior da câmara de plasma por descarga elétrica direta. Foram usados *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* como indicadores biológicos, inoculados em placas de Petri constituídas em vidro de 10cm de diâmetro. Os resultados indicaram que, comparado ao plasma de O₂, a efetividade do plasma de peróxido de hidrogênio foi de duas a três vezes superior, sendo esta alta eficiência devido à presença de altíssima concentração de partículas ativas, também duas a três vezes maior do que no plasma de oxigênio, sendo elas principalmente radicais HO° e HO₂°, as quais estimulam rapidamente a desintegração de novas moléculas, exacerbando a magnitude de formação de radicais livres. Ao contrário do que foi descrito anteriormente por outros autores (KHOMICH *et al.*, 1997; KHOMICH *et al.*, 1998), a radiação ultravioleta gerada pelo plasma de H₂O₂ exerceu papel discreto na inativação microbiana.

Os experimentos de Soloshenko e colaboradores foram ainda mais abrangentes. Neles foram apresentados ampla gama de possíveis estados de dissociação das moléculas de O₂ e principalmente H₂O₂, relatando as energias necessárias para o rompimento de ampla gama de ligações, inclusive envolvendo a participação, função e distribuição eletrônica em ambos os plasmas, sendo que para o plasma de H₂O₂, a densidade eletrônica é substancialmente superior (SOLOSHENKO *et al.*, 2002). Assim, as principais reações químicas envolvidas podem ser resumidas como segue:

Em concordância com esses achados, Gaunt e colaboradores (2006) avaliaram vários mecanismos de dano celular envolvendo ozônio (O₃), radiação

(UV, IR e visível) e espécies reativas de oxigênio, como oxigênio atômico (O), superóxido (O_2^-), HO_2° e hidroxila (HO°). Diferentes mecanismos de injúria celular foram considerados (principalmente relacionados aos radicais HO° e atribuídos a cada uma das espécies reativas, concluindo que pesquisas adicionais devem ser realizadas a fim esclarecer sobre a sensibilidade de cada microrganismo em particular frente a determinada(s) espécie(s) reativa(s) e condições sub-letais/letais.

Fica claro que a composição do gás empregado na geração do plasma e as respectivas entidades reativas formadas a partir da sua ativação representa fator importantíssimo na letalidade microbiana, e portanto na efetividade do processo.

Contrariamente no que tange à influência de gases/misturas gasosas e tipo de geração de plasma citados por vários autores, trabalho realizado por D'Agostino e colaboradores (1990) apontou que vários tipos de gases e substâncias não gasosas utilizadas para geração de plasma são esterilizantes eficientes no que diz respeito à destruição de esporos bacterianos, de forma similar e independente do tipo de descarga elétrica utilizada para gerar plasma (O_2 , N_2 , ar ambiente, H_2 , halogênios, N_2O , H_2O , CO_2 , SO_2 , SF_6 , aldeídos e ácidos orgânicos).

Tem sido difícil encontrar consenso no que diz respeito ao papel da radiação UV na letalidade microbiana. Muitos experimentos apontam para a direção de que os fótons UV exercem papel fundamental na esterilização (CHAU *et al.*, 1996; KHOMICH *et al.*, 1997; KHOMICH *et al.*, 1998; SOLOSHENKO *et al.*, 1999; SOLOSHENKO *et al.*, 2000; MOREAU *et al.*, 2000; LEROUGE *et al.*, 2001; MOISAN *et al.*, 2002; SOLOSHENKO *et al.*, 2002), enquanto que outros parecem não concordar (KELLY-WINTENBERG *et al.*, 1998; HURY *et al.*, 1998; GADRI *et al.*, 2000; NAGATSU *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2006; HAYASHI *et al.*, 2006). Entretanto, analisando os experimentos desses diversos autores chega-se à conclusão que esta questão muito provavelmente está relacionada com a diversidade de condições experimentais utilizadas. Tal conclusão também é suportada por Moisan e colaboradores (2001), Boudan e colaboradores (2006), bem como por Lerouge e colaboradores (2000b), que inclusive apontam a variação no comprimento de

onda da radiação, a potência aplicada, a pressão e a composição do gás como principais fatores interferentes.

Para auxiliar esclarecimento desta controvérsia, Boudan e colaboradores recentemente simularam condições experimentais muito similares, entretanto ajustaram um ambiente onde a radiação UV está presente e outro aonde não há radiação UV, e isso foi possível simplesmente variando a concentração de NO₂ adicionado ao gás N₂. Os resultados obtidos são esclarecedores, e mostram que quando são fornecidas concentrações de zero, 40 e 200ppm de NO₂, a intensidade da radiação UV é grande e representa o principal mecanismo de inativação microbiana. Por outro lado, ao se fornecer 1.000ppm de NO₂, não se verifica presença dessa radiação e as espécies reativas são responsáveis pela letalidade microbiana. Ainda, é preciso ressaltar que no primeiro caso, ocorre, simultaneamente, erosão da superfície microbiana por espécies reativas derivadas do oxigênio, e portanto, o resultado final é o sinergismo entre os dois eventos (BOUDAM *et al.*, 2006).

Ao se atentar para ambos os modos de geração de plasma utilizados, ou seja, sistema de plasma com acoplamento capacitivo modo *Reactive Ion Etching* (RIE) e sistema de plasma de alta densidade com acoplamento indutivo modo *Inductively Coupled Plasma* (ICP), encontrou-se limitação para comparar diretamente a influência dos modos de geração sobre a letalidade dos monitores biológicos, uma vez que foram utilizadas quatro potências distintas, a saber, 100, 150, 200 e 300W.

Comentários a respeito da dificuldade em se comparar resultados publicados até o momento englobam, principalmente, três fatores: (a) o comportamento dos esporos submetidos a tratamentos sob plasma nem sempre é linear; (b) a resistência dos esporos não depende somente da cepa escolhida, mas também dos métodos usados na sua preparação, regeneração, material e geometria dos suportes, sua concentração e distribuição nos mesmos; (c) parâmetros de exposição ao plasma (não claramente descritos quando publicados nos artigos e patentes, dificultando portanto sua reprodução) (LEROUGE *et al.*, 2000c).

6.2 Compatibilidade polimérica do plasma

Em adição à questão da eficácia esterilizante, outro aspecto inerente ao uso de metodologias esterilizantes compatíveis termicamente com materiais poliméricos abrange aspectos físicos e químicos destes materiais, onde possíveis alterações poderiam limitar ou impedir o uso de peças confeccionadas em polímeros.

Nos últimos anos muito têm-se estudado a respeito deste aspecto, especialmente alterações estruturais em polímeros envolvendo esterilização por radiação ionizante (CLOUGH & SHALABY, 1996; PRUITT *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 1999; YU-E *et al.*, 1999) e eletrôn acelerado (RAVAT *et al.*, 2000; RAVAT *et al.*, 2001). Neste sentido, tornou-se fundamental a necessidade de se investigar a metodologia empregando plasma no âmbito de possíveis alterações físicas e químicas destes materiais.

Uma vez que foram utilizados dois sistemas de plasma empregando O₂ e H₂O₂, há que comentar acerca das principais características de ambos, principalmente no que diz respeito às entidades reativas geradas e como atuariam quando em contato com os polímeros. Alguns autores descrevem hipóteses que podem elucidar melhor essa questão (LEROUGE *et al.*, 2000c; SOLOSHENKO *et al.*, 2002).

Os experimentos de Soloshenko e colaboradores apresentaram ampla gama de possíveis estados de dissociação das moléculas para ambos plasma de O₂ e principalmente H₂O₂, relatando as energias necessárias para o rompimento de ampla gama de ligações, inclusive envolvendo a participação, função e distribuição eletrônica em ambos os plasmas, sendo que para o plasma de H₂O₂, a densidade eletrônica é substancialmente superior (SOLOSHENKO *et al.*, 2002). Assim, as principais reações químicas envolvidas podem ser resumidas como segue:

A importância do papel das espécies reativas contendo oxigênio também foi minuciosamente estudada por Gaunt e colaboradores, que ressaltaram os radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) como fundamentais para promover extenso dano a ligações químicas (GAUNT *et al.*, 2006).

Alguns dados coletados sugerem oxidação e corrosão (*etching*) em nível estritamente superficial provocada principalmente por espécies reativas contendo O_2 (LEROUGE *et al.*, 2000a; LEROUGE *et al.*, 2002), enquanto que alterações em nível interno ao polímero, ou seja, sua massa interna ou também denominado *bulk* parecem não ocorrer. Entretanto, ainda não há consenso sobre a aplicabilidade benéfica do plasma abrangendo os diversos polímeros utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares (LEROUGE *et al.*, 2002; GOLDMAN & PRUITT, 1998; GOGOLEWSKI *et al.*, 1996).

Vários autores concordam, após intenso estudo, que o comportamento das primeiras camadas superficiais pode interferir na biocompatibilidade, rugosidade, espessura, hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade do polímero, enquanto que o comportamento da massa interna se relaciona diretamente com as propriedades físicas e mecânicas do mesmo, sendo que alterações nesse nível podem englobar aspectos como o rearranjo das cadeias poliméricas (rompimento de cadeias, formação de ligações cruzadas), alterações relacionadas aos aditivos (degradação), amarelamento e outros (LEROUGE *et al.*, 2000a; LEROUGE *et al.*, 2002; GOLDMAN & PRUITT, 1998; GOGOLEWSKI *et al.*, 1996; STUART, 1996; MANO & MENDES, 1999; RABELLO, 2000; CANEVAROLO Jr, 2004; KLAPPERICH *et al.*, 2001; SIDOUNI *et al.*, 2001; KACZMAREK *et al.*, 2002; AOUINTI *et al.*, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK *et al.*, 2006).

Assim, decisão acerca da abrangência de polímeros estudada foi baseada em relatos de literatura acerca da sensibilidade dos mesmos ao método esterilizante por radiação ionizante (CLOUGH & SHALABY, 1996; PRUITT *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 1999; YU-E *et al.*, 1999), e feixe de elétrons acelerado (RAVAT *et al.*, 2000; RAVAT *et al.*, 2001). Foram selecionados, portanto, o poli (cloreto de vinila) - PVC, polietileno de alta densidade (HDPE), polipropileno (PP), poliuretano (PUR) e o policarbonato (PC), cujas fórmulas

estruturais e/ou principais rotas de síntese estão apresentadas nas Figuras 1 a 5. Os polímeros utilizados no presente estudo são polímeros termoplásticos comumente utilizados na fabricação de produtos médico-hospitalares de uso único.

Optou-se por utilizar chapas *in natura* dos principais polímeros utilizados na confecção de produtos médico-hospitalares, ao invés das próprias peças. A razão está atrelada ao fato de que a maioria das peças possui configuração tubular ou irregular, o que impediria seu emprego como amostra para alguns dos métodos analíticos utilizados, que requerem superfícies lisas e aderentes aos porta amostras, além de cumprir também com a padronização da espessura de todas as chapas, que foi de 1mm.

Adicionalmente, são incorporados aditivos distintos (plastificantes, lubrificantes, estabilizantes, pigmentos, cargas, espumantes, antiestáticos, retardantes de chama, nucleantes, modificadores de impacto, entre outros) ao processo produtivo de produtos médico-hospitalares, bem como produção de polímeros para aplicações distintas, a fim de agregar determinadas características físicas e mecânicas às peças confeccionadas (RABELLO, 2000; LEROUGE *et al.*, 2000a), os quais são substâncias químicas de natureza diversa e que fatalmente seriam uma interferência adicional aos métodos analíticos físico-químicos escolhidos. Desta forma, a escolha das chapas intencionou minimizar ao máximo a possibilidade de existência de tais substâncias.

É preciso ressaltar que a aquisição e o uso de amostras comerciais resultou na falta absoluta de informações com relação à síntese de tais polímeros e sua composição final por parte dos produtores, dificuldade esta experimentada na execução do presente trabalho.

Na investigação do comportamento dos polímeros escolhidos frente ao processo de plasma, foi necessária a utilização de técnicas analíticas de caracterização de tais materiais em distintos níveis de profundidade, uma vez que possíveis modificações podem afetar tanto suas camadas superficiais como sua massa interna, podendo levar a alterações das principais propriedades e comprometendo seu emprego. Dentre as técnicas adequadas para tal estudo, citam-se métodos espectroscópicos, microscópicos, termodinâmicos, e outros complementares, como métodos biológicos (MERRET *et al.*, 2002; CANEVAROLO Jr, 2004; USP 29, 2006). Foram utilizados no

presente trabalho a espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR), a microscopia eletrônica de varredura (SEM), a perfilometria, a microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) e a citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar.

As técnicas de espectroscopia vibracional são úteis para o estudo de alterações estruturais em muitos materiais, pois relaciona a interação da radiação eletromagnética com a matéria. A energia ou o comprimento de onda da radiação incidente determina o tipo de transição ou interação que ocorre entre a radiação e a matéria, sendo basicamente três processos distintos: absorção (no infravermelho-IR), emissão (fluorescência) e espalhamento (Raman) (STUART, 1996; STUART, 1997; KAWANO, 2004).

As moléculas apresentam movimento vibracional definido denominado de vibração normal. Radiações incidentes com números de onda na faixa de 12.800 a 4.000 cm^{-1} (infravermelho próximo-NIR) e 4.000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio-MIR) levam a interações envolvendo vibrações moleculares do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção. As vibrações de estiramento ainda podem ser do tipo simétrico, anti-simétrico, degenerado, em fase, fora de fase e pulsação de anel (STUART, 1996; STUART, 1997; KAWANO, 2004).

As frequências vibracionais de uma molécula dependem da natureza do movimento, massa dos átomos, geometria da molécula, natureza das ligações químicas e ambiente químico/físico. Assim, a espectroscopia vibracional torna-se ferramenta poderosa na identificação de grupos funcionais, conformação e estrutura de macromoléculas, pois permite a obtenção do espectro vibracional completo da molécula (STUART, 1996; STUART, 1997; KAWANO, 2004).

Para realizar adequadamente a atribuição de bandas de espectros vibracionais de uma molécula, deve ser efetuada a análise de coordenadas normais que descrevem os modos usuais de vibração. No caso de polímeros, trata-se de tarefa árdua e nem sempre possível de ser realizada (KOENIG, 1992).

Informações acerca de alterações poliméricas de diferentes naturezas ocorridas em polímeros distintos puderam ser melhor esclarecidas através de espectroscopia vibracional no IR. Oxidação em implantes de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) (CHEN *et al.*, 1999), hidrólise enzimática em

polímeros biodegradáveis (PAMULA *et al.*, 2001), bem como rompimento de cadeias e formação de ligações cruzadas em compósitos de colágeno e polipropileno (TYAN *et al.*, 2003), utilizaram esta técnica como principal ferramenta analítica de caracterização polimérica.

6.2.1 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR)

Para o presente estudo, foi utilizada a espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR), sendo considerada método indireto de se obter o espectro vibracional IR da molécula. Os equipamentos modernos agregam fonte de luz, interferômetro de Michelson e célula de amostragem com microfone embutido.

O funcionamento consiste na modulação de um raio de luz IR que a seguir é focalizado sobre a amostra através de janela transparente e de gás hélio, que envolve a amostra, a qual absorve a radiação e gera o “som” como ondas quentes, aquecendo o gás em volta. Por ser produzido através de luz com frequência modulada, esse processo de aquecimento é periódico. As alterações de pressão (como resultado do aquecimento e relaxamento da amostra) imitam ondas sonoras, que são registradas por microfone de alta sensibilidade e são conhecidas como sinais fotoacústicos (CAHEN, 1980; CIURCZAK, 1999).

As principais vantagens desta metodologia residem na facilidade de obtenção dos espectros com pequenas quantidades de material, não destrutiva, fácil utilização e baixa sensibilidade à morfologia da amostra, podendo esta ser sólida, líquida ou gasosa. (KAWANO, 2004)

A técnica, e em especial devido às vantagens descritas acima, apresentou-se ferramenta importante para estudos de diferentes naturezas, como nível de penetração de aditivos em polímeros (YANG *et al.*, 1987; SOWA *et al.*, 1996), padrão de adesão de compostos em superfícies induzida por radiação (YUE-E *et al.*, 1999) e caracterização do perfil de profundidade na

adesão de camadas de coberturas comestíveis e microrganismos em superfície de frutas (YANG *et al.*, 2001). Ainda, segundo Yang e colaboradores, a técnica apresentou-se excelente na caracterização conformacional de estruturas químicas distintas e identificação de grupos funcionais em moléculas orgânicas.

Os espectros obtidos na região do infravermelho médio, onde cada banda pode ser considerada como vibração particular de ligações ou grupamentos químicos, podem ter várias bandas, assim, o espectro pode ser considerado a impressão digital da molécula, onde, de acordo com a estrutura de cada molécula, podem ocorrer bandas em diversas regiões (STUART, 1996; STUART, 1997).

Exemplificando, cita-se a região do estiramento X-H (4.000 a 2.500cm^{-1}), onde as bandas do estiramento C-H ocorrem na região do espectro entre 2.970 e 2.850cm^{-1} (entre 2.965 e 2.880cm^{-1} para grupamentos CH_3 e entre 2.930 e 2.860cm^{-1} para grupamentos CH_2), sendo possível verificar estiramento simétricos e anti-simétricos para tais ligações. Para o estiramento N-H de amidas, as bandas ocorrem na região de 3.400 a 3.300cm^{-1} , enquanto que para grupamento O-H as bandas ocorrem entre 3.700 e 3.600cm^{-1} . O estiramento C-H de compostos aromáticos podem ocorrer na região 3100 e 3000cm^{-1} (STUART, 1996; STUART, 1997).

Citam-se ainda as bandas na região do estiramento das ligações triplas (2.500 a 2.000cm^{-1}) e ligações duplas (2.000 a 1.500cm^{-1}), principalmente a banda do grupo carbonila C=O, que é muito forte e facilmente reconhecida no espectro infravermelho, e dependendo do tipo de ligação adjacente, pode se localizar na região entre 1.830 e 1.650cm^{-1} . A banda do estiramento C=C é mais fraca e ocorre em cerca de 1.650cm^{-1} , sendo que a banda referente à ligação C=N também ocorre nesta região e é mais forte que a anterior (STUART, 1996; STUART, 1997).

As bandas observadas entre 1.500 e 400cm^{-1} representam a maior parte das frequências vibracionais fundamentais, região esta denominada de “região de impressão digital”, rica em informação para todas as moléculas, estando nessa região a banda referente ao grupamento C-Cl que ocorre em frequência de 700cm^{-1} (KAWANO, 2004; STUART, 1996; STUART, 1997).

As bandas anteriormente descritas foram o ponto de partida para análise dos espectros obtidos, os quais foram comparados entre si e também com espectros da literatura (SADTLER, 1985; STUART, 1996; STUART, 1997).

No caso dos polímeros estudados, os espectros obtidos em cerca de 10µm de profundidade para as cinco amostras não expostas e as vinte e cinco amostras expostas ao plasma sob diferentes combinações de parâmetros podem ser visualizadas nas Figuras de 40 a 44, tendo sido agrupadas por tipo de polímero.

Ao se analisar o espectro obtido para a amostra do PVC (Figura 1) não exposto ao plasma (Figura 40a), verificam-se bandas que foram atribuídas aos seguintes grupamentos: ombro atribuído ao estiramento C-H de composto aromático em 3020 cm⁻¹; estiramento CH₂ anti-simétrico entre 2.916 e 2.842cm⁻¹; estiramento C-Cl entre 699 e 617cm⁻¹; estiramento C=O em frequência de 1.732cm⁻¹ e estiramento C-O-C em frequência de 1.099cm⁻¹ (STUART, 1996; STUART, 1997). O ombro das duas últimas bandas não fazem parte do espectro do PVC original (SADTLER, 1985), e poderiam ser atribuídos a moléculas químicas adicionada ao processamento como aditivo. O PVC é um polímero que pode receber ampla gama de aditivos e em grandes quantidades, principalmente plastificantes que aumentam grandemente sua flexibilidade. Dentre os compostos químicos utilizados têm-se os ftalatos, sendo o mais usado o di-2-etil-hexil-ftalato ou dioctil ftalato (DOP) (RABELLO, 2000).

Outros autores descrevem ainda que mesmo polímeros não submetidos a qualquer processo de esterilização podem conter certo grau de oxidação atribuído principalmente a condições de processamento (LEROUGE *et al.*, 2000a), evidenciando portanto tais ligações contendo oxigênio.

Entretanto, é interessante notar que ao se analisar o espectro do PVC não exposto com os expostos, em nenhuma das condições foram observadas mudanças significativas nas posições e nas intensidades relativas das bandas, sugerindo insignificantes ou ausência de alterações a uma profundidade de cerca de 10µm. Ainda para o PVC, buscou-se a presença de bandas referentes a outros grupos oxidados como o estiramento O-H em frequência de 3.640 a 3.400cm⁻¹, não tendo sido observadas (STUART, 1996; STUART, 1997).

Kaczmarek e colaboradores (2002) utilizaram plasma de ar ambiente e compararam sua atuação em filmes de PVC purificados frente à exposição dos mesmos à radiação UV, onde puderam constatar que o plasma promoveu ampla oxidação, mas restrita às primeiras camadas superficiais do polímero, alterando sua hidrofilicidade. Neste caso, as camadas mais profundas também foram afetadas, mas não pelo plasma e sim sofreram vasta oxidação devido penetração da radiação UV, sendo esses patamares de penetração não mencionados. Em ambos os casos, os fenômenos puderam ser comprovados por diferentes técnicas, inclusive espectroscopia vibracional.

Em continuidade ao trabalho, pôde-se atribuir as seguintes bandas ao espectro IR do HDPE (Figura 2) não exposto ao processo por plasma (Figura 41a): estiramento CH_2 anti-simétrico e simétrico, respectivamente, em 2.927 e 2.857cm^{-1} ; deformação angular CH_2 em 1476cm^{-1} e balanço *rocking* do grupo CH_2 em 726cm^{-1} (STUART, 1996; STUART, 1997). Essas bandas encontradas são similares às bandas de todas as chapas de HDPE expostas sob as quatro condições, pressupondo imperceptíveis ou ausentes modificações, em profundidade de cerca de $10\mu\text{m}$, decorrentes do processo. Adicionalmente, não foram encontradas bandas referentes a grupos oxidados como estiramento C=O em frequência de 1.830 a 1.650cm^{-1} e estiramento O-H (3.640 a 3.400cm^{-1}) (STUART, 1996; STUART, 1997), pressupondo não ocorrência de oxidação decorrente do processo por plasma e ausência de aditivos contendo grupamentos com ligações com oxigênio.

Outros autores (KLAPPERICH *et al.*, 2001), trabalhando com exposição de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) sob plasma de Ar, C_3F_6 , CH_4 e NH_4 observaram modificações que incluíram formação de ligações CF_3 e CF_2 , entretanto, tal modificação se manteve apenas na superfície dos cupons de $2,5\text{mm}$ de espessura, ficando claro que a parte interna ou *bulk* do polímero não foi afetada. Esses resultados suportam achados de Borgia e colaboradores (2004a), que evidenciaram oxidação em polímeros e formação de ligação C-O em polímeros que normalmente não tem oxigênio, entre eles o HDPE, quando submetidos a plasma de ar atmosférico e descarga DBD, oxidação que permaneceu somente em nível superficial.

A presença de grupos oxidados (C=O, C-O, O-C=O) também foram encontrados em amostras de LDPE expostos a plasma indutivo utilizando gás Ar, sendo que mais uma vez tais modificações se restringiram à superfície dos *pellets* expostos e tiveram sua magnitude aumentada com a proximidade das amostras da fonte geradora de plasma (TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006). Grupos oxidados como peróxido, ester, carbonila, hidroxila, amida e grande número de ligações duplas foram encontrados também para HDPE expostos em plasma de Ar, sendo que sua concentração máxima não ultrapassou patamar superficial de 25nm (SVORCIK *et al.*, 2006).

As bandas atribuídas ao PP (Figura 3) não exposto ao processo por plasma (Figura 42a) constituíram: estiramento CH₃ anti-simétrico e simétrico entre 2.975 e 2.880cm⁻¹ e entre 2.930 e 2.860cm⁻¹ para grupamentos CH₂; deformação CH₃ assimétrica em 1.457cm⁻¹ (PAINTER *et al.*, 1977); deformação CH₃ simétrica em 1.377cm⁻¹, sendo um singleto; *twisting* do grupo CH₂ em 1.161cm⁻¹ (STUART, 1996; STUART, 1997); estiramento simétrico C-O-C em 1.000cm⁻¹ e deformação angular fora do plano do grupo C-H de benzeno em 972cm⁻¹ (McCARTHY *et al.*, 1997). As duas últimas bandas não fazem parte da molécula do PP, aparecendo também no espectro do PP não exposto, pressupondo a presença de aditivo contendo tais ligações ou algum nível de oxidação durante o processo como reportado anteriormente (LEROUGE, 2000a). Visualizou-se ainda a banda em 838cm⁻¹ que se refere ao balanço *rocking* do grupo CH₂ (PAINTER *et al.*, 1977). Ao se comparar tais bandas com as bandas atribuídas às chapas de PP que foram submetidas ao plasma sob as quatro condições de parâmetros estabelecida, fica evidente a semelhança de suas intensidades e posições, levando ao estabelecimento de indetectáveis ou ausentes modificações, em profundidade de cerca de 10μm, decorrentes do processo por plasma. Bandas referentes a grupos oxidados como estiramento C=O em frequência de 1.830 a 1.650cm⁻¹ e estiramento O-H (3.640 a 3.400cm⁻¹) (STUART, 1996; STUART, 1997) não foram encontradas, indicando não ocorrência de oxidação decorrente do processo por plasma e ausência de aditivos contendo grupamentos com ligações com oxigênio.

Semelhantemente a estudos de alguns autores (TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK *et al.*, 2006) que trabalharam com

polietileno, Strobel e colaboradores trabalharam com polipropileno expostos a diferentes condições de plasma de ar ambiente e UV/ozônio. O estudo constatou a presença de grupos oxidados (C=O, C-O, O-C=O), e mais uma vez tais modificações se restringiram à superfície dos filmes de 0,4mm de espessura, tendo sido muito rápidas, sendo que sua concentração máxima detectada não ultrapassou patamar superficial de 4nm. (STROBEL *et al.*, 1995). Ainda, à semelhança de Kaczmarek e colaboradores que trabalharam com PVC exposto à plasma e radiação UV (KACZMAREK *et al.*, 2002), os resultados de Strobel e colaboradores apontam para oxidação menos intensa quando o PP também foi exposto à radiação UV, entretanto, atingiu camadas mais internas, ou seja, a massa ou *bulk* do PP (STROBEL *et al.*, 1995). Em concordância, filmes de PP de 100µm foram submetidos à plasma de CO₂, tendo sido verificada oxidação superficial em profundidade de 10nm, provocada por fragmentos do gás, principalmente monóxido de carbono, oxigênio atômico e molecular decorrente de recombinação (AQUINTI *et al.*, 2003).

No caso das chapas de PUR (Figura 4), o espectro IR (Figura 43a) obtido em profundidade de cerca de 10µm forneceu as seguintes bandas para o polímero não exposto: para o estiramento N-H de amidas, a banda ocorreu na frequência de 3.290cm⁻¹; estiramento C-H de composto aromático em 3.019cm⁻¹; estiramento CH₂ anti-simétrico e simétrico entre 2.939 e 2.866cm⁻¹; estiramento C=O em frequência de 1.731cm⁻¹ (STUART, 1996; STUART, 1997; ANDERSON *et al.*, 1998); deformação angular do grupo N-H + estiramento C-N em 1.533cm⁻¹; *wagging* de grupos CH₂ alifáticos em 1.370cm⁻¹; estiramento C-N em 1.231cm⁻¹ (McCARTHY *et al.*, 1997); estiramento C-O-C em frequência de 1.107cm⁻¹ (LEROUGE *et al.*, 2000a) e deformação angular fora do plano de grupo C-H em 928cm⁻¹. Essas frequências são compatíveis com dados de literatura para a molécula de PUR original (SADTLER, 1985). Ao se analisar esse padrão com o obtido para o PUR exposto sob as quatro condições definidas, mais uma vez observa-se a semelhança de suas intensidades e posições, levando ao estabelecimento de sutis ou mesmo ausentes modificações decorrentes do processo por plasma. Outras bandas contendo grupos ligados ao oxigênio como O-H (3.640 a 3.400cm⁻¹) que evidenciariam possível oxidação não foram encontradas.

Lerouge e colaboradores (2000a) relatam diferentes resultados com catéteres em PUR submetidos a plasma de H_2O_2 . Foi encontrado certo grau de oxidação na superfície polimérica usando espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS), resultado este que não foi evidenciado quando utilizada outra metodologia, a espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier e reflectância total atenuada (ATR-FTIR). Segundo os autores, isso pode ser explicado devido aos diferentes graus de profundidade de penetração das duas técnicas analíticas: O XPS atinge cerca de 10nm, limitando-se à superfície polimérica onde as alterações puderam ser detectadas, enquanto o ATR-FTIR atinge a profundidade de 1 a 5 μm , portanto penetra mais profundamente no polímero, local este não alterado por processos empregando plasma (LEROUGE *et al.*, 2000a; LEROUGE *et al.*, 2002).

Comparativamente, alto nível de oxidação com formação de grupos $-\text{OH}$ e rompimento de cadeias, mesmo sob vácuo, de amostras de PUR termoplástico foram evidenciados por espectroscopia vibracional (estiramento à 3.500cm^{-1}) em profundidades atingindo cerca de 150 a 250 μm (massa ou *bulk*), entretanto, tais mudanças foram ocasionadas por exposição em equipamento com feixe de elétrons, e foram tanto mais intensas quanto maior foi a energia incidente, chegando a atingir 500 μm (RAVAT *et al.*, 2000). Posteriormente, estudo adicional evidenciou através da mesma técnica taxa de oxidação maior com o aumento gradual do fluxo de elétrons, atingindo profundidades de cerca de 200 μm , padrão que não se repetiu com o aumento da temperatura, tendo ocasionado o decréscimo da taxa de oxidação do PUR termoplástico estudado (RAVAT *et al.*, 2001).

Finalizando a análise dos polímeros por espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR) em profundidade de cerca de 10 μm , para as chapas de PC (Figura 5) foram atribuídas as seguintes bandas (Figura 44a): estiramento C-H de grupo aromático em 3.046cm^{-1} ; estiramento CH_3 anti-simétrico e simétrico, respectivamente, em 2.969 e 2.878cm^{-1} ; estiramento C=O em frequência de 1.785cm^{-1} ; estiramento de anel em 1.505cm^{-1} (STUART, 1996; STUART, 1997); estiramento C-O-C na região entre 1.084 e 1.020cm^{-1} (LEROUGE *et al.*, 2000a) e deformação angular fora do plano do grupo C-H em 838cm^{-1} (McCARTHY *et al.*, 1997). Foram comparadas

as bandas obtidas para o PC não exposto com as obtidas para as chapas expostas sob as quatro condições definidas, e novamente observa-se semelhante padrão de intensidades e posições, levando a informações relacionadas a insignificantes ou mesmo ausentes modificações decorrentes do processo por plasma. Outras bandas contendo grupos ligados ao oxigênio como O-H (3.640 a 3.400cm^{-1}) que indicariam possível oxidação não foram novamente encontradas.

Achados de Borgia e colaboradores (2004b) evidenciaram oxidação em PC e outros polímeros que possuem oxigênio na estrutura fundamental quando expostos a plasma de ar ambiente e descarga DBD, com consequente formação de ligações C-O, C=O e O-C-O, entretanto, tal situação foi evidenciada somente na superfície dos polímeros estudados, sendo que a massa dos polímeros não foi afetada. Estes dados são portanto complementares a estudo anterior dos mesmos autores quando trabalhando com polímeros que não possuem oxigênio na estrutura fundamental como o HDPE (BORCIA *et al.*, 2004a).

Extrapolando para os perfis sem alterações significativas encontradas entre as amostras expostas e não expostas para os cinco polímeros estudados, a explicação é concordante com o achado de Lerouge e colaboradores (2000a; 2002). A profundidade alcançada pela técnica de PAS-FTIR utilizada no presente trabalho foi de cerca de $10\mu\text{m}$, profundidade atribuída à massa do polímero segundo alguns autores (McCARTHY *et al.*, 1997; SOWA *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2001; AOUINTI *et al.*, 2003). Assim, os resultados sugerem que ambos sistemas de plasma e gases não promoveram alterações internamente ao polímero (massa ou *bulk*), levando-se em conta a profundidade de cerca de $10\mu\text{m}$ atingida pela análise, suportando grande número de pesquisas que mostraram que o plasma atua nas primeiras camadas superficiais de polímeros (em escala de nm) e outros materiais, seja provocando alterações intencionalmente planejadas para agregar finalidades específicas ou mesmo indesejáveis (KLAPPERICH *et al.*, 2001; SIDOUNI *et al.*, 2001; KACZMAREK *et al.*, 2002; AOUINTI *et al.*, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK *et al.*, 2006).

Dado importante acerca da profundidade de penetração do raio incidente reside no fato de que a mesma é dependente da velocidade do espelho móvel do interferômetro. Assim, é possível obter espectros IR a diferentes profundidades na mesma amostra, variando a velocidade de deslocamento do espelho, o que possibilita aplicação da técnica tendo em vista o estudo das primeiras camadas superficiais de materiais (CAHEN, 1980; CIURCZAK, 1999; KAWANO, 2004).

Tal situação foi confirmada por Yang e colaboradores (1987), que exploraram justamente diferentes padrões de velocidade do espelho móvel versus nível de profundidade atingida pela radiação em amostras de algodão, fibra de vidro tratada, fibras de poli (tereftalato de etileno) - PET e um compósito natural de PVC. Através desse padrão de variação, foi possível investigar inclusive o grau de penetração de certos aditivos nos polímeros escolhidos. Mesmo conceito foi utilizado em investigação acerca da profundidade de penetração e distribuição de aditivos, compostos sulfonados, em filmes de cerca de 88µm de espessura de polietileno de baixa densidade (LDPE) tratados com H₂SO₄ para incrementar sua biocompatibilidade, tendo sido utilizados diferentes velocidades do espelho do interferômetro, possibilitando uma varredura superficial e em diferentes profundidades (SOWA *et al.*, 1996). Filmes de 90µm de espessura de borracha de cloropreno foram submetidos à radiação gama para possibilitar inclusão de 2-hidroxi-etil-metacrilato, tendo então sido avaliado o grau de penetração do composto usando diferentes velocidades de varredura (YUE-E *et al.*, 1999). No âmbito alimentício, diferentes perfis de profundidade foram também demonstrados em estudo envolvendo caracterização de coberturas comestíveis e presença de microrganismos em superfícies de frutas, correlacionando com espectros bi-dimensionais (YANG *et al.*, 2001).

Ao se atentar para os espectros obtidos para os cinco polímeros (Figuras 40 a 44), é possível visualizar interferências (ruídos), o que pode ter como causas variações na fonte, na purga da célula, no sinal óptico e no detector (KAWANO, 2004).

6.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) e perfilometria

Em continuidade ao estudo, foi realizada avaliação da rugosidade por microscopia eletrônica de varredura e perfilometria de todas as 25 amostras não expostas e expostas (Figuras 45 a 49 e Tabela 19). As fotomicrografias denotam mudança visual na rugosidade de todos os polímeros expostos, em comparação com os polímeros não expostos, padrão que se repetiu nos valores numéricos relativos à rugosidade média (Ra) coletados por perfilometria para todas as combinações de parâmetros de plasma.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM) têm sido muito utilizada em conjunto com outras técnicas de caracterização de polímeros e outros materiais, fornecendo informações valiosas a respeito da morfologia de inúmeros tipos de superfícies e subsídios na investigação do seu comportamento frente a situações das mais diferentes naturezas, como efeitos físicos e morfológicos decorrentes de diferenciados processos de tratamento de superfícies.

A literatura relata algumas aplicações desta técnica como por exemplo na investigação de efeitos físicos ocasionados na superfície de HDPE e outros polímeros decorrentes da exposição à plasma de ar ambiente gerado por descarga DBD (BORCIA *et al.*, 2004a), investigação do nível de adesão celular em superfícies de poli (tereftalato de etileno) - PET submetido a distintos tratamentos de superfície (WANG *et al.*, 2005) e estudo de mudanças estruturais em folhas de 40µm de espessura decorrentes da exposição à plasma de Ar (SVORCIK *et al.*, 2006).

Recentes avanços envolvendo SEM foram relatados por Clode (2006), onde foi desenvolvido sistema de microscopia utilizando diferentes pressões de vácuo. Os resultados elucidaram aspectos que melhoram significativamente a execução da técnica analítica e a condição dos dados gerados, proporcionando, por exemplo, que a amostra analisada não precise ser recoberta por camada superficial de metal condutivo para possibilitar visualização das imagens, bem como melhorando aspectos relacionados à qualidade das imagens fornecidas pelo equipamento, como por exemplo, o contraste.

No presente trabalho, quando procurou-se avaliar alteração visual da rugosidade, existiu limitação em se perceber as sutis diferenças na rugosidade dos polímeros expostos ocasionadas por ambos sistemas de plasma (RIE e ICP), bem como para ambos os gases (O_2 e sua mistura com H_2O_2) para a maioria das combinações, exceto para o PP e o PUR, onde pode-se observar claramente que o maior aumento da rugosidade foi relacionado ao sistema ICP quando utilizado a mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$ (Figuras 47 e 48).

Desta forma, buscou-se correlacionar os resultados numéricos obtidos pela perfilometria com o panorama visual da microscopia, a fim de se esclarecer sobre a influência de ambos sistemas de plasma (RIE e ICP), assim como a influência do O_2 puro e sua mistura utilizando H_2O_2 , tendo sido então verificado um padrão definido para tais mudanças .

Na busca por métodos que aumentem a biocompatibilidade de próteses, a técnica de perfilometria mostrou-se ferramenta útil na avaliação da rugosidade de diferentes biocerâmicas utilizadas como substrato para o crescimento de células derivadas de ossos humanos, tendo sido verificada sua influência na biocompatibilidade das células, juntamente com as características químicas de tais substratos (ZREIQAT *et al.*, 1999).

Padrão diferenciado de rugosidade foi encontrado em experimentos de Gorna e Gogolewski, onde a técnica de perfilometria evidenciou situações de aumento na rugosidade média (R_a), bem como diminuição, variando conforme o tipo de gás utilizado na geração de plasma. Para alguns casos, o valor chegou a ser 200% maior do que a rugosidade inicial (polímeros não expostos), entretanto, os motivos para tal variação foram duvidosos, levando os autores a sugerir estudos adicionais (GORNA & GOGOLEWSKI, 2003).

Levando em consideração o presente estudo, ao se comparar a rugosidade média (R_a) das amostras expostas, pode-se verificar que, considerando ambos os sistemas de plasma, os maiores valores foram obtidos para o sistema ICP, para ambos os gases (Tabela 19). Este sistema utiliza duas fontes de geração de potência no interior do reator, uma superior indutiva (bobina) e outra inferior capacitiva (eletrodo), enquanto que o sistema RIE utiliza somente o eletrodo capacitivo. Esse fato, levou à maior potência aplicada ao sistema ICP (300W) quando comparado ao sistema RIE (150W)

pode ter causado maior magnitude de ataque das entidades reativas à superfície dos polímeros expostos ao plasma sistema ICP e levando a maior nível de alteração da sua rugosidade. A influência do aumento da potência de RF também foi investigada por Soloshenko e colaboradores em estudos de eficácia esterilizante (SOLOSHENKO *et al.*, 1999).

Por outro lado, quando se considera a influência de ambos os gases, O₂ puro e sua mistura utilizando H₂O₂, verifica-se que a maior alteração da rugosidade foi devida à mistura O₂ + H₂O₂, para todos os polímeros expostos e considerando ambos os sistemas de plasma (Tabela 19). Provável explicação pode estar atrelada à potencialização do O₂ pelo H₂O₂, mistura esta capaz de gerar entidades muito mais reativas (principalmente HO° e HO₂°) quando comparadas àquelas geradas somente por plasma de oxigênio (principalmente (O)), potencialização que também foi verificada em estudos de eficácia esterilizante efetuados por outros autores (LEROUGE *et al.*, 2000c; SOLOSHENKO *et al.*, 2002).

Esses dois padrões também compatibilizam com os resultados relacionados à eficácia esterilizante, onde o plasma gerado em sistema ICP e potência RF de 300W, bem como a mistura gasosa O₂ + H₂O₂ forneceram os menores valores de D (Tabelas 17 e 18), isto é, provocaram maior letalidade dos sensores dos monitores biológicos avaliados, os esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, recentemente reclassificado como *Bacillus atrophaeus* (FRITZE & PUKALL, 2001)

Em experimento com LDPE submetido à plasma em sistema ICP usando gás Ar, pressão de 0,5Torr, potência de RF em 1200W, fluxo de gás em 100sccm e tempo de exposição de 15min, foram obtidos padrões de aumento de rugosidade (através de AFM) acompanhando a distância da amostra com relação à fonte de potência (zero, 30 e 58cm) (TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006).

Aumento do perfil de rugosidade também foi evidenciado para amostras de filmes de 5cm² e 100µm de espessura de PP expostas em sistema de plasma de microondas usando gás CO₂, potência de 60W e fluxo de gás de 20sccm. Tais perfis foram diretamente proporcionais ao tempo de exposição, que variou entre 30s e 9min, tendo sido evidenciados por microscopia de força atômica (AFM) (AOUINTI *et al.*, 2003).

Foi interessante notar na Tabela 19 que o HDPE não exposto apresentou rugosidade média (R_a) de 4.437, portanto muito superior à rugosidade média dos polímeros expostos (valores entre 346 e 540), o que não aconteceu para os outros quatro polímeros, revelando situação um tanto incoerente num primeiro momento. Entretanto, quando se atenta para as fotomicrografias do HDPE não exposto e amostras expostas ao plasma, fica clara a alteração da rugosidade dos polímeros expostos frente ao não exposto, sendo que a fotomicrografia mostra ainda grandes fissuras no HDPE que não foi submetido ao processo. Tais fatos levam a se considerar que podem ter havido limitações analíticas no momento do dimensionamento da rugosidade média (R_a) dessa amostra, podendo ter ocorrido um desvio da agulha ao atingir uma dessas grandes fissuras, gerando então um valor que corresponderia à altura do degrau da fissura, e não das imperfeições inerentes à rugosidade do material não exposto, valor este cerca de dez vezes maior quando comparado aos valores obtidos para os polímeros expostos (Tabela 19). Estas considerações podem ser suportadas por Verdonck em trabalho de pesquisa utilizando perfilometria (VERDONCK, 1998).

Trabalho de Svorcik e colaboradores ajudaram a elucidar a questão apresentada anteriormente. Folhas de HDPE foram expostas à plasma de Ar e avaliadas quanto a modificações químicas de superfície (oxidação), ablação, hidrofobicidade e mudança no padrão de rugosidade. Após crescentes tempos de exposição variando entre zero e 400s, e potência de 1,7W, ocorreu pronunciado aumento na rugosidade do polímero, proporcional aos tempos de exposição e evidenciado por técnicas de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia de força atômica (AFM) (SVORCIK *et al.*, 2006).

Investigando alterações superficiais intencionais a fim de melhorar características desejadas, diversos polímeros foram expostos à plasma de ar ambiente e descarga de barreira dielétrica (DBD). Mudanças intensas foram observadas para todas as amostras, especialmente o HDPE, que sofreu alteração em apenas 5 s de exposição (evidenciada por SEM) (BORCIA *et al.*, 2004a).

Tais pesquisas suportam a tese de erro analítico, indicando que o HDPE sofre aumento no padrão de rugosidade após exposição ao processo por plasma.

6.2.3 Microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS)

Informações sobre possíveis mudanças na distribuição atômica dos polímeros após submissão aos processos podem ser obtidas através de microanálise, representando também recurso adicional a fim de elucidar o grau de oxidação das primeiras camadas superficiais expostas, através da obtenção das concentrações elementares das amostras em percentagem e sua posterior razão atômica entre oxigênio e carbono (O/C) (STROBEL *et al.*, 1995; LEROUGE *et al.*, 2000a; SIDOUNI *et al.*, 2001; AOUINTI *et al.*, 2003; GORNA & GOGOLEWSKI, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; VINOGRADOV & LUNK, 2005; WANG *et al.*, 2005).

Para que isso fosse possível, foi utilizado mais uma vez o microscópio eletrônico de varredura (SEM), dotado de sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) que possibilitou identificação e quantificação dos elementos químicos dos polímeros expostos e não expostos aos processos de plasma RIE e ICP. A profundidade do feixe de elétrons respeitou as primeiras camadas iniciais e se restringiu à 0,5µm.

Sistema similar EDS empregando raios X mostrou-se poderosa ferramenta na caracterização de ionômeros de polietileno-ácido metacrílico recristalizados contendo elementos como Na e Zn, bem como quantificação dos átomos de carbono dos agregados, tendo sido usada varredura superficial de 1nm de profundidade (TAUBERT & WINEY, 2002).

Os valores apresentados nas Tabelas 20 a 24 evidenciam aumento da razão O/C das chapas poliméricas expostas a todas as condições de plasma, tendo em vista todos os polímeros estudados, a saber, PVC, HDPE, PP, PUR e PC, evidenciando a atuação das entidades reativas do plasma ((O), HO° e HO₂° e outros) na promoção de novas ligações químicas envolvendo átomos de oxigênio, bem como suportando os achados de vários pesquisadores quanto à promoção dessa oxidação polimérica abrangendo as primeiras camadas superficiais (KLAPPERICH *et al.*, 2001; KACZMAREK *et al.*, 2002; AOUINTI *et al.*, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; TAJIMA & KOMVOPOULOS, 2006; SVORCIK *et al.*, 2006).

Mais ainda, esses resultados são especialmente concordantes com distintas fases das pesquisas de Lerouge e colaboradores (2000a; 2002) que verificaram que uma varredura (usando espectroscopia vibracional) em camadas mais profundas não puderam detectar oxidação por plasma nos polímeros estudados, mas tal fenômeno efetivamente ocorreu, e pôde ser detectado somente nas camadas mais superficiais usando técnica que promoveu varredura em tais camadas, a espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS).

Ao se atentar detalhadamente para os resultados da razão O/C no presente estudo, evidencia-se suporte aos dados gerados pela SEM e perfilometria, onde os maiores graus de oxidação ocorreram a partir da exposição dos polímeros em sistema ICP, para ambos os gases. No sistema ICP, a utilização dos dois geradores de potência (bobina e eletrodo) resultando em maior potência aplicada (300W) levou a um aumento na magnitude de ataque das entidades reativas à superfície dos polímeros expostos ao plasma sistema ICP e acarretando maior nível de oxidação, ou seja, maior valor de razão atômica entre oxigênio e carbono (Tabelas 20 a 24). Soloshenko e colaboradores, em estudos de eficácia esterilizante também evidenciaram a influência do aumento da potência de RF promovendo maior letalidade de microrganismos (SOLOSHENKO *et al.*, 1999).

Em se considerando a influência de ambos os gases, O₂ puro e sua mistura utilizando H₂O₂, verifica-se que o maior nível de oxidação foi devido à mistura O₂ + H₂O₂, para todos os polímeros expostos, e considerando ambos os sistemas de plasma (Tabela 20 a 24). Mais uma vez, tal situação pode estar atrelada à potencialização do O₂ pelo H₂O₂, mistura esta capaz de gerar entidades muito mais reativas (principalmente HO° e HO₂°) quando comparadas àquelas geradas somente por plasma de oxigênio (principalmente (O)), potencialização que também foi verificada em estudos de eficácia esterilizante efetuados por outros autores (LEROUGE *et al.*, 2000c; SOLOSHENKO *et al.*, 2002).

Adicionalmente, os dados coletados pela técnica de microanálise mostraram a presença de outros elementos distintos das estruturas originais dos polímeros estudados, como flúor, sódio, silício, alumínio, potássio, titânio, bromo, estanho e cálcio, em proporções variáveis. A razão pode estar atrelada

à possível contaminação da câmara de plasma utilizada para o presente estudo, que se destina também a estudos de corrosão de outros materiais de natureza química diversa. Lerouge e colaboradores também obtiveram presença de silício na superfície dos catéteres de PUR estudados, fato atribuído a possível contaminação durante o processamento de tais peças (LEROUGE *et al.*, 2000a).

A oxidação da superfície de polímeros tem sido amplamente relatada na literatura, tendo em vista trabalhos de pesquisa realizados por diversos autores, como sendo o efeito mais comum da exposição aos mais diversos tipos de sistemas de plasma (STROBEL *et al.*, 1995; LEROUGE *et al.*, 2000a; SIDOUNI *et al.*, 2001; LEROUGE *et al.*, 2002; AOUINTI *et al.*, 2003; BORCIA *et al.*, 2004a; BORCIA *et al.*, 2004b; VINOGRADOV & LUNK, 2005; WANG *et al.*, 2005).

Sistemas de plasma envolvendo descarga de barreira dielétrica, sistema de geração por chama e descarga de microondas em ar ambiente foram testados em filmes de PP e PET, tendo sido evidenciada rápida oxidação de ambas superfícies e obtidas razões O/C maiores do que 0,10 em apenas 0,5 segundo de exposição (STROBEL *et al.*, 1995).

Polímeros que normalmente não contém oxigênio na estrutura original (PVC, HDPE, LDPE, PTFE, PS) (BORCIA *et al.*, 2004a) e outros providos dessa ligação (Nylon 6[®], Nylon 6.6[®], Nylon 12[®], PET, PC) (BORCIA *et al.*, 2004b) foram submetidos à tratamento em plasma de ar ambiente e descarga de barreira dielétrica (DBD). Todos demonstraram rápida oxidação de superfície (primeiro grupo) e oxidação adicional para o segundo grupo, mesmo sobre curtos tempos de exposição, com concentração de oxigênio notavelmente acima à dos polímeros originais não expostos. Salienta-se que estes tratamentos usando plasma tiveram intenção de modificar as superfícies a fim de melhorar determinadas características, demonstrando aplicabilidade benéfica do processo.

Gorna e Gogolewski obtiveram resultados mostrando discrepância na taxa de oxidação de PUR biodegradáveis que aumentou quando as amostras foram submetidas a plasma de O₂ e H₂O₂. Entretanto, essa taxa sofreu decréscimo quando utilizando plasma de CO₂ e NH₃. O caráter de ambos

padrões foi atribuído aos tipos de entidades reativas geradas a partir dos diferentes plasmas, bem como na estrutura química diferenciada dos compostos de PUR biodegradáveis (GORNA & GOGOLEWSKI *et al.*, 2003).

6.2.4 Citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em ágar

Como última etapa do presente estudo, avaliou-se citotoxicidade das cinco amostras não expostas e vinte expostas, tendo sido usadas células de tecido conjuntivo de camundongo, linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC CCL1) padronizada e reprodutível, de acordo com critérios oficiais (USP 29, 2006). Portanto, o uso de tais células torna adequada a comprovação da ausência (ou não) da citotoxicidade dos polímeros expostos ao processo empregando plasma, tendo sido usadas também em relevantes trabalhos de pesquisa (FRESHNEY, 1987; CRUZ, 2003; AZEVEDO, 2004).

A Figura 50 mostra a avaliação macroscópica do controle positivo e negativo, sendo que a Figura 51 mostra a zona limítrofe do halo formado pelo controle positivo em nível microscópico. Este padrão ilustra os critérios de citotoxicidade adotados, sendo que sua graduação foi determinada conforme orientação da USP 29ª edição, onde estão descritos os distintos índices de zona (IZ) de zero a quatro e sendo consideradas tóxicas as amostras com $IZ > 2$ (USP 29, 2006).

Os fragmentos dos polímeros diretamente expostos à camada confluyente de células foram analisados macro e microscopicamente, não tendo sido constatada presença de halo claro sob ou ao redor de cada amostra testada em triplicata, portanto, $IZ=zero$ e idênticas ao controle negativo do teste (Figura 50a). Isso aconteceu para todas as amostras de polímeros, expostos e não expostos, evidenciando que o processo por plasma, em ambos sistemas (RIE e ICP) e gases (O_2 e $O_2 + H_2O_2$), não ocasionou modificações químicas ou físicas que pudessem ter levado ao aparecimento de citotoxicidade (resultados não fotografados).

A cultura de células enquanto teste para avaliação de citotoxicidade de materiais tem se mostrado vantajosa, reunindo características como boa sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e diminuição do uso de animais de laboratório. Dados da avaliação da citotoxicidade de catéteres urinários de látex frente à quatro ensaios biológicos foram comparados (citotoxicidade em cultura celular, injeção intracutânea dos extratos em coelhos, implante intramuscular dos fragmentos dos catéteres em coelhos e cateterização de ovelhas-teste de irritação de mucosa). Comparando principalmente sensibilidade e aplicabilidade prática, o teste de citotoxicidade em cultura celular com captura de vermelho neutro se mostrou adequado, cumprindo com as características descritas (GRAHAM *et al.*, 1984).

Polímeros com aplicações biomédicas, expostos em sistemas de plasma com finalidades diversas, tem sido caracterizados química e fisicamente por inúmeros métodos, e tornando a avaliação a mais completa possível, somam-se então ensaios microbiológicos, contribuindo para se uso seguro e eficaz.

O comportamento de cupons de polietileno de altíssimo peso molecular expostos a sistemas de plasma usando Ar, C₃F₆, CH₄ e NH₄ foram avaliados quanto à citotoxicidade através de contato direto com camada confluenta de células, usando fragmentos de látex como controle positivo e de silicone como controle negativo. A inclusão do corante MTT, comumente conhecido como brometo de difenil-tetrazólio foi observada em todos os testes, revelando que os tratamentos sofridos pelos polímeros não levaram à sua toxicidade (KLAPPERICH *et al.*, 2001).

O comportamento de diferentes linhagens de células tem encontrado aplicabilidade importante no esclarecimento da citotoxicidade de diferentes materiais. Dentre elas, destacam-se as células de fibroblasto de camundongo clone L929, usada também no presente trabalho. Exemplos do uso de tais células abrangem estudo de citotoxicidade de homopolímeros e copolímeros de 2-hidroxietil-metacrilato para potencial uso como pele temporária artificial (PRASITSILP *et al.*, 2003), citotoxicidade de biosistemas poliméricos baseados em oligo-caprolactona dimetacrilato e seu aditivo n-butil acrilato projetados para fins implantáveis (RICKERT *et al.*, 2003), citotoxicidade de frações despolimerizadas com diferentes pesos moleculares e concentrações do

polímero chitosan (MAO *et al.*, 2004), citotoxicidade de bio-poliésteres implantáveis temporários sintetizados por bactérias e comparáveis a polímeros sintéticos (PP, PE, PET) submetidos à método de degradação acelerada (SHANGGUAN *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÕES

- O calibre interno dos catéteres influenciou a letalidade dos esporos dos monitores biológicos, tendo sido observada maior letalidade dos esporos posicionados no catéter de 7mm de diâmetro interno em comparação ao catéter de 1mm de diâmetro interno, para todas as combinações de parâmetros de processo;
- Ambas as potências de 150W para o sistema RIE e 300W para o sistema ICP aplicadas provocaram maior letalidade dos esporos posicionados no interior de ambos os monitores biológicos, fornecendo menores valores de D;
- A mistura gasosa utilizando $O_2 + H_2O_2$ foi mais efetiva na letalidade dos esporos microbianos depositados no interior de ambos os monitores biológicos e para ambos os sistemas de plasma estudados;
- Todas as condições empregadas mostraram efeito promissor na redução da carga microbiana, nos dois tipos de monitores biológicos empregados, frente à dificuldade de acesso ao perímetro interno dos produtos médico-hospitalares de calibres reduzidos e longa extensão utilizados;
- Quando usada espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformadas de Fourier (PAS-FTIR), não foram evidenciadas modificações estruturais significativas em cerca de 10 μ m de profundidade quando comparados polímeros não expostos e expostos ao processo por plasma sob todas as condições;

- Foi evidenciado aumento na rugosidade média (Ra) de todos os polímeros expostos ao processo, sob todas as condições estudadas, reveladas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e perfilometria, tendo sido o sistema ICP e a mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$ a condição mais agressiva;
- Foi evidenciada oxidação em nível superficial ($0,5\mu m$), através do método de microanálise em sistema *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS), em todos os polímeros expostos ao plasma quando comparados aos não expostos sob todas as condições avaliadas, tendo sido o sistema ICP e a mistura gasosa $O_2 + H_2O_2$ a condição mais agressiva;
- Não foram observadas modificações químicas ou físicas que pudessem ter levado ao aparecimento de citotoxicidade nos polímeros estudados após sua submissão ao processo e sob todas as combinações de parâmetros quando testada a citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar.
- Tendo em vista as conclusões obtidas no presente estudo, bem como aspectos descritos por distintos pesquisadores abrangendo diversidade de condições experimentais, engenharia de equipamentos, composição e configuração de produtos, torna-se fundamental a continuidade das pesquisas, a fim de proporcionar a reunião de ampla gama de informações, tornando possível a utilização comercial de processos de esterilização empregando plasma reprodutíveis, efetivos e seguros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADDY, T.O. **Low temperature plasma**: a new sterilization technology for hospital applications. In: INTERNATIONAL KILMER MEMORIAL CONFERENCE ON THE STERILIZATION OF MEDICAL PRODUCTS, 5, Morin Heights, 1989. **Proceedings**. Morin Heights: Polyscience, 1991. p.80-95. [Johnson & Johnson Medical].
2. ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N.; HIZON, R. Comparison of liquid chemical sterilization with peracetic acid and ethylene oxide sterilization for long narrow lumens. **American Journal of Infection Control**, v.26, p.469-477, 1998.
3. ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N.; PUCHALSKI, T. Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.2, p.92-100, 1996.
4. ANDERSON, J.M.; HILTNER, A.; WIGGINS, M.J.; SCHUBERT, M.A.; COLLIER, T.O.; KAO, W.J.; MATHUR, A.B. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. **Polymer International**, v.46, p.163-171, 1998.
5. ANDERSON, M.H. Gas plasma sterilization: innovation in practice. **Navy Medicine**, v.80, n.5, p.9-10, 1989.
6. AOUINTI, M.; BERTRAND, P.; PONCIN-EPAILLARD, F. Characterization of polypropylene surface treated in a CO₂ plasma. **Plasmas and Polymers**, v.8, n.4, p.225-236, 2003.
7. AZEVEDO, J.C. **Segurança biológica de implantes mamários de silicone**: interrelação entre processos esterilizantes e biocompatibilidade. São Paulo, 2004. 91p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
8. BÄR, W.; BÄR, G.M.; NAUMAN, A.; RÜSCH-GERDES, S. Contamination of bronchoscopes with *Mycobacterium tuberculosis* and successful sterilization by low-temperature hydrogen peroxide plasma sterilization. **American Journal of Infection Control**, v.29, p.306-311, 2001.
9. BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**: em suas aplicações à medicina e à higiene. 18.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1977. p.843.
10. BORCIA, G.; ANDERSON, C.A.; BROWN, N.M.D. The surface oxidation of selected polymers using an atmospheric pressure air dielectric barrier discharge. Part I. **Applied Surface Science**, v.221, p.203-214, 2004a.

11. BORCIA, G.; ANDERSON, C.A.; BROWN, N.M.D. The surface oxidation of selected polymers using an atmospheric pressure air dielectric barrier discharge. Part II. **Applied Surface Science**, v.225, p.2186-197, 2004b.
12. BOUCHER, R.M.G. State of the art in gas plasma sterilization. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.7, p.51-56, 1985.
13. BOUDAM, M.K.; MOISAN, M.; SAOUDI, B.; POPOVICI, C.; GHERARDI, N.; MASSINES, F. Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.39, p.3494-3507, 2006.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria Interministerial n.3, de 01 de julho de 1988**. Aprova o Regulamento Técnico n.RT-008/87 - "Bolsas Plásticas para Acondicionamento de Sangue Humano e seus Componentes". Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3940&word=>. Acesso em: 26 jan. 2007.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.2043, de 12 de dezembro de 1994**. Institui o Sistema de Garantia da Qualidade de produtos correlatos submetidos ao regime da Lei n.6.360, de 27 de setembro de 1976 e o Decreto n.79.094, de 05 de janeiro de 1977. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=723&word=>. Acesso em: 26 jan. 2007.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria Interministerial n.482, de 16 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico e seus Anexos, objeto desta Portaria, contendo disposições sobre os procedimentos de instalações de Unidade de Esterilização por óxido de etileno e de suas misturas e seu uso, bem como, de acordo com as suas competências, estabelecer as ações sob a responsabilidade do Ministério da Saúde e Ministério do Trabalho e Emprego. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1537&word=>. Acesso em: 26 jan. 2007.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.185, de 22 de outubro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22426&word=>. Acesso em: 26 jan. 2007.

18. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Resolução n.267, de 14 de setembro de 2000**. Proibição de substâncias que destroem a camada de ozônio. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/ambtec/legislacao/267_2000_Oz%F4nio_proib_e_subs_destroem_cam_Ozon.doc. Acesso em: 26 jan. 2007.
19. BRIONES Jr., A.M.; REICHARDT, W. Estimating microbial population counts by most probable number using microsoft excel^R. **Journal of Microbiological Methods**, v.35, p.157-161, 1999.
20. BRYCE, E.A.; CHIA, E.; LOGELIN, G.; SMITH, J.A. An evaluation of the AbTox Plazlyte Sterilization System. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.18, n.9, p.646-53, 1997.
21. BURGESS, D.J.; REICH, R.R. Industrial ethylene oxide sterilization. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology: a practical guide for manufactures and users of health care products**. New York: Morrissey, 1993. cap.7, p.152-195.
22. BUSSMANN, I.; PHILIPP, B.; SCHINK, B. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, p.41-50, 2001.
23. CAHEN, D. Photoacoustic in life sciences. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.3, p.293-310, 1980.
24. CANEVAROLO Jr., S.V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber, 2004. 183p.
25. CARSON, L.A.; PETERSEN, N.J.; FAVERO, M.S.; DOTO, I.L.; COLLINS, D.E.; LEVIN, M.A. Factors influencing detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by most-probable-number and membrane filtration techniques. **Applied Microbiology**, v.30, n.6, p.935-942, 1975.
26. CHAN-MYERS, H.; McALISTER, D.; ANTONOPLOS, P. Natural bioburden levels detected on rigid lumened medical devices before and after cleaning. **American Journal of Infection Control**, v.25, p.471-476, 1997.
27. CHAU, T.T.; KAO, K.C.; BLANK, G.; MADRID, F. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. **Biomaterials**, v.17, n.13, p.1273-1277, 1996.
28. CHOI, J.H.; HAN, I.; BAIK, H.K.; LEE, M.H.; HAN, D.W.; PARK, J.C.; LEE, I.S.; SONG, K.M.; LIM, Y.S. Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge. **Journal of Electrostatics**, v.64, p.17-22, 2006.

29. CHU, N.S.; CHAN-MYERS, H.; GHAZANFARI, N.; ANTONOPLOS, P. Levels of naturally occurring microorganisms on surgical instruments after clinical use and after washing. **American Journal of Infection Control**, v.27, p.315-319, 1999.
30. CIURCZAK, E.W. Aplicações da espectroscopia por infravermelho fotoacústica. **Pharmaceutical Technology: Edição Brasileira**, v.3, n.4, p.11-12, 1999.
31. CLODE, P.L. Charge contrast imaging of biomaterials in a variable pressure scanning electron microscope. **Journal of Structural Biology**, v.155, n.3, p.505-511, 2006.
32. CLOUGH, R.L.; SHALABY, S.W. **Irradiation of polymers: fundamentals and technological applications**. Washington: American Chemical Society, 1996. 433p. (ACS Symposium series, 620) (Developed from a symposium sponsored by the Division of Polymer Chemistry, Inc., at the 208th. National Meeting of the American Chemical Society, Washington, DC, August 21-25, 1994).
33. COLLIER, J.P.; SUTULA, L.C.; CURRIER, B.H.; CURRIER, J.H.; WOODING, R.E.; WILLIAMS, I.R.; FARBER, K.B.; MAYOR, M.B. Overview of polyethylene as a bearing material: comparison of sterilization methods. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.1, n.333, p.76-86, 1996.
34. CRUZ, A.S. **Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos**. São Paulo, 2003. 107p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
35. CVELBAR, U.; VUJOSEVIC, D.; VRATNICA, Z.; MOZETIC, M. The influence of substrate material on bacteria sterilization in an oxygen plasma glow discharge. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.39, p.3487-3493, 2006.
36. D'AGOSTINO, R.; RATNER, B.D.; CHILKOTI, A.; LOPEZ, G.P., eds. **Plasma deposition, treatment and etching of polymers**. Boston: Academic Press, 1990. 528p. (Plasma – materials interactions).
37. DEN ELZEN, M.G.J.; SWART, R.J.; ROTMANS, J. Strengthening the Montreal Protocol: does it cool down the greenhouse? **Science of the Total Environment**, v.113, n.3, p.229-250, 1992.
38. ECCLES, J.P.; SEARLE, R.; HOLT, D.; DENNIS, P.J. A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.2, p.375-383, 2004.

-
39. ELIASSON, B.; KOGELCHATZ, U. Nonequilibrium volume plasma chemical processing. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.19, p.1063-1077, 1991.
 40. FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. p.v.5.1.6.3-v.5.1.6.5.
 41. FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397p.
 42. FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.51, p.35-37, 2001.
 43. GADRI, R.B.; ROTH, J.R.; MONTIE, T.C.; WINTENBERG, K.K.; TSAI, P.P.-Y.; HELFRITCH, D.J.; FELDMAN, P.; SHERMAN, D.M.; KARAKAYA, F.; CHEN, Z. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). **Surface and Coatings Technology**, n.131, p.528-542, 2000.
 44. GARDELLA Jr., J.A.; JIANG, D.Z.; MCKENNA, W.P.; EYRING, E.M. Applications of Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR/PAS) to surface and corrosion phenomena. **Applications of Surface Science**, v.15, p.36-49, 1983.
 45. GAUNT, L.F.; BEGGS, C.B.; GEORGHIOU, G.E. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.34, n.4, p.1257-1266, 2006.
 46. GOGOLEWSKI, S.; MAINIL-VARLET, P.; DILLON, J.G. Sterility, mechanical properties, and molecular stability of polylactide internal – fixation devices treated with low-temperature plasmas. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.32, p.227-235, 1996.
 47. GOLDMAN, M.; LEE, M.; GRONSKY, L.; PRUITT, L. Oxidation of ultrahigh molecular weight polyethylene characterized by Fourier transform infrared spectrometry. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.37, p.43-50, 1997.
 48. GOLDMAN, M.; PRUITT, L. Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behaviour of UHMWPE. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.40, p.378-384, 1998.

49. GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D.E.; ECHLIN, P.; JOY, D.C.; ROMING Jr., A.D.; LYMAN, C.E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**: a text for biologists, materials scientists, and geologists. 2.ed. New York: Plenum Press, 1992. cap.12, p.635-639.
50. GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S. Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperature plasma. **Polymer Degradation and Stability**, v.79, p.475-485, 2003.
51. GRAHAM, D.T.; MARK, G.E.; POMEROY, A.R.; MACARTHUR, E.B. *In vivo* validation of a cell culture test for biocompatibility testing of urinary catheters. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.18, p.1125-1135, 1984.
52. GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHMIDT, B.; AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.54, p.1545-1547, 1965.
53. HAYAKAWA, I.; FURUKAWA, S.; MIDZUNAGA, A.; HORIUCHI, H.; NAKASHIMA, T.; FUJIO, Y.; YANO, Y.; ISHIKURAQ, T.; SASAKI, K. Mechanism of inactivation of heat-tolerant spores of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12250 by rapid decompression. **Journal of Food Science**, v.63, n.3, p.371-374, 1998.
54. HAYASHI, N.; GUAN, W.; TSUTSUI, S.; TOMARI, T.; HANADA, Y. Sterilization of medical equipment using radicals produced by oxygen/water vapor RF plasma. **Japanese Journal of Applied Physics**, v.45, n.10B, p.8358-8363, 2006.
55. HERMELIN, I.J.; BURTIN, C.; LEVERGE, R.; PRUGNAUD, J.-L. Côté de fonctionnement de deux systèmes de stérilisation à basse température, centralisé et decentralize. **Journal of Pharmacie Clinique**, v.17, n.3, p.138-144, 1998.
56. HOEFEL, H.H.K. **Esterilização**. In: CIH Hoefel e Colaboradores. Materiais. Disponível em: <http://www.cih.com.br/>. Acesso em: 15 abr. 2002.
57. HOLY, C.E.; CHENG, C.; DAVIES, J.E.; SHOICHET, M.S. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. **Biomaterials**, n.22, n.1, p.25-31, 2001.
58. HURY, S.; VIDAL, D.R.; DESOR, F.; PELLETIER, J.; LAGARDE, T. A parametric study of the destruction efficiency of bacillus spores in low pressure oxygen-based plasmas. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.417-421, 1998.

-
59. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. **ISO 10.993-5**: biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: *in vitro* methods. Geneva: ISO, 1999. 7p.
60. JACOBS, P.T. **Sterrad* sterilization system**: a new technology for instrument sterilization. Arlington, Texas: Johnson & Johnson, Advanced Sterilization Products Medical, 1994. p.1-33.
61. JAYABALAN, M. Sterilization and reprocessing of materials and medical devices reusability. **Journal of Biomaterials Applications**, v.10, p.97-112, 1995.
62. KACZMAREK, H.; KOWALONEK, J.; SZALLA, A.; SIONKOWSKA, A. Surface modification of thin polymeric films by air-plasma or UV irradiation. **Surface Science**, v.507/510, p.883-888, 2002.
63. KATZ, J. Developments in medical polymers for biomaterials applications. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.23, n.1, p.122-132, 2001.
64. KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho/espectroscopia fotoacústica no infravermelho. In: CANEVAROLO Jr., S.V., coord. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. 448p.
65. KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L.; WEKELL, M.M.; STOTT, R.F.; COLBURN, K.G. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.12, p.3072-3079, 1989.
66. KELLY-WINTENBERG, K.; MONTIE, T.C.; BRICKMAN, C.; ROTH, J.R.; CARR, A.K.; SORGE, K.; WADSWORTH, L.C.; TSAI, P.P.Y. Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.20, n.1, p.69-74, 1998.
67. KHOMICH, V.A.; SOLOSHENKO, I.A.; TSIOLKO, V.V.; MIKHNO, I.L. Cold sterilization of medical devices and materials by plasma DC glow discharge. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GAS DISCHARGE AND THEIR APPLICATIONS, 12, Greifswald, 1997. **Proceedings**. Greifswald, 1997. v.2, p.740-744.
68. KHOMICH, V.A.; SOLOSHENKO, I.A.; TSIOLKO, V.V.; MIKHNO, I.L. Investigation of principal factors of the sterilization by plasma DC glow discharge. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLASMA PHYSICS, Prague, 1998. **Proceedings**. Prague, 1998. v.22C, p.2745-2748.
-

-
69. KHORASANI, M.T.; ZAGHIYAN, M.; MIRZADEH, H. Ultra high molecular weight polyethylene and polidimethylsiloxane blend as acetabular cup material. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.41, p.169-174, 2005.
70. KLAPPERICH, C.; PRUITT, L.; KOMVOPOULOS, K. Chemical and biological characteristics of low-temperature plasma treated ultra-high molecular weight polyethylene for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.12, p.549-556, 2001.
71. KREBS, M.C.; BÉCASSE, P.; VERJAT, D.; DARBORD, J.C. Gas plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. **International Journal of Pharmaceutics**, n.160, p.75-81, 1998.
72. KRISHNAN, K.; HILL, S.; HOBS, J.P.; SUNG, C.S.P. Orientation measurements from polymer surfaces using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.36, n.3, p.257-259, 1982.
73. KUCHMA, T.N.; SAMOILENKO, I.I.; ALIPOV, Ye.E.; LYSTSOV, V.N. Study of the mechanisms of the combined action of microwave electromagnetic radiation and hydrogen peroxide on the viability of microorganisms. **Biophysics**, v.41, n.2, p.427-434, 1996.
74. KUTASI, K.; PINTASSILGO, C.D.; COELHO, P.J.; LOUREIRO, J. Modeling of a post-discharge reactor used for plasma sterilization. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.39, p.3978-3988, 2006.
75. LAGE, L.G. **Poliuretanas**: caracterização, avaliação estrutural e efeito induzido pela radiação gama. São Paulo, 2003. 144p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
76. LEROUGE, S.; FOZZA, A.C.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; YAHIA, L.'H. Sterilization by low pressure plasma: the role of vacuum-ultraviolet radiation. **Plasmas and Polymers**, v.5, p.31-46, 2000b.
77. LEROUGE, S.; GUIGNOT, C.; TABRIZIAN, M.; FERRIER, D.; YAGOUBI, N.; YAHIA, L.H. Plasma-based sterilization: effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p.774-782, 2000a.
78. LEROUGE, S.; TABRIZIAN, M.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; YAHIA, L.H. Safety of plasma-based sterilization: surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v.12, p.3-13, 2002.
-

-
79. LEROUGE, S.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.H. Effect of gas composition on spore mortality during low-pressure plasma sterilization. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.51, p.128-135, 2000c.
80. LEROUGE, S.; WERTHEIMER, M.R.; YAHIA, L.H. Plasma sterilization: a review of parameters, mechanisms and limitations. **Plasmas and Polymers**, v.6, n.3, p.175-188, 2001.
81. LISOVSKII, V.A.; YAKOVIN, S.D.; YEGORENKOV, V.D.; TEREENT'EVA, A.G. Plasma sterilization in low-pressure RF discharges. **Problems of Atomic Science and Technology, Series: Plasma Physics**, v.1, p.77-81, 2000.
82. LOURENÇO, F.R.; AZEVEDO, J.C.; AMARAL, C.M.O.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Determinação da biocarga em localizadores magnéticos para definição de parâmetros de radiação esterilizante. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, supl.1, p.184-186, 2004.
83. LUNDHOLM, M.; NYSTRÖM, B. Validation of low temperature sterilizers: are spore preparations suitable biological indicators? **Zentralsterilisation**, v.2, p.370-374, 1994.
84. MANERO, J.M.; GIL, F.J.; PADROS, E.; PLANELL, J.A. Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.469-480, 2003.
85. MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução à polímeros**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999. 191p.
86. MANZER, L.E. The CFC-ozone issue: progress on the development of alternatives to CFCs. **Science**, v.249, n.4964, p.31-35, 1990.
87. MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D.; KISSEL, T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.281, p.45-54, 2004.
88. MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; WITTMAR, M.; XIE, X.; KISSEL, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-grafted-trimethyl chitosan block copolymers. **Biomaterials**, v.26, p.6343-6356, 2005.
89. McCARTHY, S.J.; GORDON, F.M.; MITCHELL, N.; GUNATILLAKE, P.A.; HEATH, G.; BRANDWOOD, A.; SCHINDHELM, K. *In vivo* degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. **Biomaterials**, v.18, p.1387-1409, 1997.
-

-
90. MEAD, G.C. Principles involved in the detection and enumeration of clostridia in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, p.135-143, 1992.
 91. MERRET, K.; CORNELIUS, R.M.; MCCLUNG, W.G.; UNSWORTH, L.D.; SHEARDOWN, H. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.13, n.6, p.593-621, 2002.
 92. MOISAN, M.; BARBEAU, J.; CREVIER, M.C.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SAOUDI, B. Plasma sterilization: methods and mechanisms. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.3, p.349-358, 2002.
 93. MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MORTEAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.226, n.1/2, p.1-21, 2001.
 94. MOISAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J.; PHILIP, N.; SAOUDI, B. Plasma sterilization: mechanisms, potential and shortcomings. **Le Vide: Science, Technique et Applications**. n.esp., p.12-18, 2001b. (Actes de 13th International Colloquium Plasma Processes (CIP 2001)).
 95. MOREAU, S.; MOISAN, M.; TABRIZIAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J.; RICARD, A.; YAHIA, L.'H. Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of operating conditions. **Journal of Applied Physics**, n.88, n.2, p.1166-1174, 2000.
 96. MOREIRA, A.J.; MANSANO, R.D.; PINTO, T.J.A.; RUAS, R.; ZAMBON, L.S.; SILVA, M.S.; VERDONCK, P.R. Sterilization by oxygen plasma. **Applied Surface Science**, v.235, p.151-155, 2004.
 97. MORRISON, C.; MACNAIR, R.; MACDONALD, C.; WYKMAN, A.; GOLDIE, I.; GRANT, M.H. *In vitro* biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. **Biomaterials**, v.16, n.13, p.987-992, 1995.
 98. MOSLEY, G.A.; GILLIS, J.R.; WHITBOURNE, J.E. Calculating equivalent time for use in determining the lethality of ETO sterilization processes. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.24, n.2, p.54-63, 2002.
 99. NAGATSU, M.; TERASHITA, F.; NONAKA, H. Effects of oxygen radicals in low-pressure surface-wave plasma on sterilization. **Applied Physics Letters**, v.86, p.1-3, 2005.

100. NAGATSU, M.; TERASHITA, F.; NONAKA, H. Effects of oxygen radicals in low-pressure surface-wave plasma on sterilization. **Applied Physics Letters**, v.86, p.1-3, 2005.
101. OHSHIMA, T.; SATA, K.; TERAUCHI, H.; SATO, M. Physical and chemical modifications of high-voltage pulse sterilization. **Journal of Electrostatics**, n.42, p.159-166, 1997.
102. OLIVEIRA, D.C. **Esterilização por óxido de etileno**: estudos de efetividade esterilizante de misturas não explosivas e compatíveis com a camada de ozônio. São Paulo, 2000. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
103. OLIVEIRA, D.C.; PINTO, T.J.A. Influência da concentração gasosa sobre a efetividade esterilizante da mistura Oxyfume 2002^R (óxido de etileno diluído em HCFCs 22 e 124). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, p.203-209, 2001.
104. OLIVEIRA, D.C.; PINTO, T.J.A. Study of sterilizing effectivity of different ethylene oxide gaseous mixtures using CFCs and HCFCs (Oxyfume 12^R and Oxyfume 2002^R). **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.56, n.5, p.242-247, 2002.
105. PADOVEZE, M.C.; DEL MONTE, M.C.C., coord. **Esterilização de artigos em unidades de saúde**. 2.ed. São Paulo: Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar, 2003. 156p.
106. PAINTER, P.C.; WATZEK, M.; KOENIG, J.L. Fourier transform infrared study of polypropylene. **Polymer**, v.18, p.1169-1172, 1977.
107. PAMULA, E.; BLAZEWICZ, M.; PALUSZKIEWICZ, C.; DOBRZYNSKI, P. FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibres composites. **Journal of Molecular Structure**, v.596, p.69-75, 2001.
108. PENNA, T.C.V.; FERRAZ, C.A. Cleaning of blood-contaminated reprocessed angiographic catheters and spinal needles. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.21, p.499-504, 2000.
109. PENNA, T.C.V.; FERRAZ, C.A.M.; CASSOLA, M.A. The presterilization microbial load on used medical devices and the effectiveness of hydrogen peroxide gas plasma against *Bacillus subtilis* spores. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.20, n.7, p.465-472, 1999.

110. PINTO, T.J.A. **Aspectos fundamentais na validação do monitor biológico para a esterilização por óxido de etileno**. São Paulo, 1991. 203p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
111. PINTO, T.J.A. Sterilization by ethylene oxide. In: *ENCYCLOPEDIA of Pharmaceutical Technology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2003. p.1-11.
112. PINTO, T.J.A. Validação de técnicas de recuperação de *bioburden* em catéteres intravenosos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76, n.1, p.26-28, 1995.
113. PINTO, T.J.A.; GARCIA-AMOEDO, L.H.; BONATO, C.B. Esterilização por óxido de etileno. **Pharmaceutical Technology: Edição Brasileira**, v.6, n.4, p.58-67, 2002.
114. PINTO, T.J.A.; GRAZIANO, K.U. Reprocessamento de artigos médico-hospitalares de uso único. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; FILHO, N.R., eds. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.1070-1077.
115. PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.83-87.
116. PINTO, T.J.A.; OLIVEIRA, D.C. Avaliação da influência da temperatura sobre a resistência (valor D) de monitores biológicos produzidos em laboratório e adquiridos comercialmente (ATTEST^R 1264, 3M), contendo *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372. **Farmácia & Química**, v.34, n.1, p.37-43, 2001.
117. PINTO, T.J.A.; SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno I. Influência do meio de esporulação na resistência dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger*. **Revista de Saúde Pública**, v.26, n.6, p.379-383, 1992.
118. PRASITSILP, M.; SIRIWITTAYAKORN, T.; MOLLOY, R.; SUEBSANT, N.; SIRIWITTAYAKORN, P.; VEERANONDHA, S. Cytotoxicity study of homopolymers and copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate and some alkyl acrylates for potential use as temporary skin substitutes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.14, p.595-600, 2003.
119. PRUITT, L.; RANGANATHAN, R. Effect of sterilization on the structure and fatigue resistance of medical grade UHMWPE. **Materials Science and Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems**, v.3, p.91-93, 1995

-
120. RABELLO, M. **Aditivação de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2000. 248p.
 121. RAO, K.V.; PANDEY, G.C. Estimation of sulphur content in copolymer powders by energy dispersive X-ray spectroscopy. **Polymer Testing**, v.10, p.31-38, 1991.
 122. RAVAT, B.; GRIVET, M.; CHAMBAUDET, A. Evolution of the degradation and oxidation of polyurethane versus the electron irradiation parameters: fluence, flux and temperature. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.179, p.243-248, 2001.
 123. RAVAT, B.; GSCHWIND, R.; GRIVET, M.; DUVERGER, E.; CHAMBAUDET, A.; MAKOVICKA, L. Electron irradiation of polyurethane: some FTIR results and a comparison with a EGS4 simulation. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.160, p.499-504, 2000.
 124. RICKERT, D.; LENDLEIN, A.; SCHMIDT, A.M.; KELCH, S.; ROEHLKE, W.; FUHRMANN, R.; FRANKE, R.P. *In vitro* cytotoxicity testing of AB-polymer networks based on oligo (caprolactone) segments after different sterilization techniques. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials**, v.67, p.722-731, 2003.
 125. RODRIGUEZ, A.C.; YOUNG, B.; CAULK, K.; ZELEWSKI, J.; KWASNICA, S.; AGUIRRE, S. Calculating accumulated lethality and survivorship in ETO sterilization processes. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.23, n.9, p.100-107, 2001.
 126. RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. London, Oxford: Blackwell Scientific, 1982, 653p.
 127. RUSSEL, J.M.; LUO, M.; CICERONE, R.J.; DEEVER, L.E. Satellite confirmation of the dominance of chlorofluorocarbons in the global stratospheric chlorine budget. **Nature**, v.379, n.6565, p.526-529, 1996.
 128. RUTALA, W.A. Disinfection and sterilization of patient-care items. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.6, p.377-384, 1996.
 129. RUTALA, W.A. Draft APIC Guideline for selection and use of disinfectants. **American Journal of Infection Control**, v.23, n.3, p.A35-A65, 1995.

130. RUTALA, W.A.; GERGEN, M.F.; WEBER, D.J. Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. **American Journal of Infection Control**, v.26, n.4, p.393-398, 1998.
131. RUTALA, W.A.; GERGEN, M.F.; WEBER, D.J. Sporicidal activity of a new low-temperature sterilization technology: the sterred 50 sterilizer. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.20, n.7, p.514-516, 1999.
132. RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Low-temperature sterilization technologies: do we need to redefine 'sterilization'? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.2, p.87-91, 1996.
133. RYCZKOWSKI, J.; PASIECZNA, S. Recent applications of FT-IR/PAS in surface science. **Journal de Physique IV: Proceedings**, v.109, p.79-88, 2003.
134. SADTLER Commercial Spectra: Infrared Grating Collection. Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1985. spect.n.D6518K, D5241P, D466K, D7550K.
135. SAMMONS, R.; MARQUIS, P. Application of the low vacuum scanning electron microscopy to the study of biomaterials and mammalian cells. **Biomaterials**, v.18, p.81-86, 1997.
136. SARTO, F.; TORNQVIST, M.A.; TOMANIN, R.; BARTOLUCCI, G.B.; OSTERMAN-GOLKAR, S.V.; EHRENBURG, L. Studies of biological and chemical monitoring of low-level exposure to ethylene oxide. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v.17, n.1, p.60-64, 1991.
137. SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; PENA, J.; PORTOLES, M.T. Transitory oxidative stress in L929 fibroblast cultured on poly(caprolactone) films. **Biomaterials**, v.26, p.5827-5834, 2005.
138. SHANGGUAN, Y.; WANG, Y.; WU, Q.; CHEN, G. The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Biomaterials**, v.27, p.2349-2357, 2006.
139. SHEN, F.; YU, Y.; McKELLOP, H. Potential errors in FTIR measurement of oxidation in ultrahigh molecular weight polyethylene implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.48, p.203-210, 1999.

140. SHINTANI, H. The relative safety of gamma-ray, autoclave and ethylene oxide gas sterilization of the thermosetting polyurethane. **Biomedical Instrumentation & Technology**, v.29, n.6, p.513-519, 1995.
141. SIDOUNI, F.Z.; NURDIN, N.; CHABRECEK, P.; LOHMANN, D.; VOGT, J.; XANTHOPOULOS, N.; MATHIEU, H.J.; FRANCOIS, P.; VAUDAUX, P.; DESCOUTS, P. Surface properties of a specifically modified high-grade medical polyurethane. **Surface Science**, v.491, p.355-369, 2001.
142. SILVA, J.M.F.; MOREIRA, A.J.; OLIVEIRA, D.C.; BONATO, C.B.; MANSANO, R.D.; PINTO, T.J.A. Comparative sterilization effectiveness of plasma in O₂-H₂O₂ mixtures and ethylene oxide treatment. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, 2007. [No prelo].
143. SILVA, M.V. **Influência da reutilização na biocompatibilidade de materiais médico-hospitalares de uso único**. São Paulo, 2002. 190p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
144. SMITH, P.G. Continuous monitoring of EtO concentrations during sterilization. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.23, n.2, p.80-88, 2001.
145. SO, J.S.; CHANG, W.S.; LEUNG, K.T.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Simultaneous detections of gfp-marked *Moraxella* sp G21r and lux-marked *Ralstonia eutrophas* H850Lr using most probable number method. **Journal of Microbiological Methods**, n.43, p.67-72, 2000.
146. SOLOSHENKO, L.A.; KHOMICH, V.A.; TSIOLKO, V.V.; MIKHNO, I.L.; SHEHEDRIN, A.I.; RYABTSEV, A.V. Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLASMA CHEMISTRY, 14, Prague, 1999. **Proceedings**. Prague, 1999. p.2551.
147. SOLOSHENKO, L.A.; TSIOLKO, V.V.; KHOMICH, V.A.; BAZHENOV, V.Y.; RYABTSEV, A.V.; SHEHEDRIN, A.I.; MIKHNO, I.L. Features of sterilization using low pressure DC discharge hydrogen peroxide plasma. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v.30, n.4, p.1440-1444, 2002.
148. SOLOSHENKO, L.A.; TSIOLKO, V.V.; KHOMICH, V.A.; SHEHEDRIN, A.I.; RYABTSEV, A.V.; BAZHENOV, V.Y.; MIKHNO, I.L. Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges. **Plasma Physics Reports**, v.26, n.9, p.792-800, 2000.

-
149. SORDELINI, P.J.; BONANNI, F.R.; FONTANA, G.A. Optimizing ETO sterilization. **Medical Device & Diagnostic Industry**, v.23, n.8, p.70-79, 2001.
 150. SOWA, M.G.; DAHLIA, F.; EYSEL, H.H.; MANTSCH, H.H. FT-IR PAS depth profiling investigation of polyethylene surface sulfonation. **Journal of Molecular Structure**, n.379, p.77-85, 1996.
 151. STEELMAN, V.M. Ethylene oxide: the importance of aeration. **AORN Journal**, v.55, n.3, p.773-785, 1992.
 152. STROBEL, M.; WALZAK, M.J.; HILL, J.M.; LIN, A.; KARBASHEWSKI, E.; LYONS, C.S. A comparison of gas-phase methods of modifying polymer surfaces. **Journal of Adhesion Science Technology**, v.9, n.3, p.365-383, 1995.
 153. STUART, B. **Biological applications of infrared spectroscopy**. Chichester, New York: John Wiley, 1997. 191p. (Analytical Chemistry by Open Learning).
 154. STUART, B. **Modern infrared spectroscopy**. Chichester: John Wiley, 1996. 180p. (Analytical Chemistry by Open Learning).
 155. SUGIURA, M.; MURASE, A.; MITSUOKA, T. Distribution analysis of functional groups in polymers by derivatization-electron probe X-ray microanalysis. **Polymer Degradation and Stability**, v.72, p.393-398, 2001.
 156. SUN, X.; KUROSU, S.; SHINTANI, H. The expanded application of most probable number to the quantitative evaluation of extremely low microbial count. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.60, n.2, p.124-134, 2006.
 157. SUWANSONTCHICHA, S.; RENGPIPAT, S. Enumeration of coliforms and *Escherichi coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.113-121, 2003.
 158. SVORCIK, V.; KOLAROVA, K.; SLEPICKA, P.; MACKOVA, A.; NOVOTNA, M.; HNATOWICZ, V. Modification of surface properties of high and low density polyethylene by Ar plasma discharge. **Polymer Degradation and Stability**, v.91, n.6, p.1219-1225, 2006.
 159. SZOPINSKI, F.G.; PUSKAR, M.A.; HECKER, L.H. Field validation of three passive dosimeters for excursion limit monitoring of ethylene oxide. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v.52, n.4, p.151-157, 1991.

160. TAJIMA, S.; KOMVOPOULOS, K. Effect of ion energy fluence on the topography and wettability of low-density polyethylene exposed to inductively coupled argon plasma. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.39, p.1084-1094, 2006.
161. TALLENTIRE, A. Quantitative aspects of microbiological controls in industrial sterilization. In: GAUGHRAN, E.R.L.; GOUDIE, A.J., eds. **Sterilization of medical products by ionizing radiation**. Montréal: Multiscience Publication, 1978. p.69-86. (International Conference on the Sterilization of Medical Products by Ionizing Radiation, Vienna, Austria, April 25-28, 1977, sponsored by Johnson & Johnson).
162. TAUBERT, A.; WINEY, K.L. Imaging and X-ray microanalysis of a poly(ethylene-ran-methacrylic acid) ionomer melt neutralized with sodium. **Macromolecules**, v.35, p.7419-7426, 2002.
163. THEMER, K.; SPANNE, P.; JONES, K.W. Mass loss during X-ray microanalysis. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v.49, p.52-59, 1990.
164. TYAN, Y.; LIAO, J.; LIN, S.; CHEN, C. The study of the sterilization effect of gamma ray irradiation of immobilized collagen polypropylene nonwoven fabric surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v.67, p.1033-1043, 2003.
165. UNITED States Pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995.
166. UNITED States Pharmacopeia: USP24; The National Formulary: NF19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000.
167. UNITED States Pharmacopeia: USP25; The National Formulary: NF20. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002.
168. UNITED States Pharmacopeia: USP26; The National Formulary: NF21. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003.
169. UNITED States Pharmacopeia: USP27; The National Formulary: NF22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004.
170. UNITED States Pharmacopeia: USP28; The National Formulary: NF23. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.
171. UNITED States Pharmacopeia: USP29; The National Formulary: NF24. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

-
172. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Física. Departamentos: Física Aplicada (FAP). Filmes Finos. **Laboratório de Filmes Finos**. Disponível em: <http://fap01.if.usp.br/> Acesso em: 10 jul. 2006.
173. VERDONCK, P.B. **Estudo sobre danos induzidos por plasma**. São Paulo, 1998. 147p. Tese de Livre Docência – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.
174. VINOGRADOV, I.; LUNK, A. Spectroscopic diagnostics of DBD in Ar/fluorocarbon mixtures – correlation between plasma parameters and properties of deposited polymer films. **Plasma Processes and Polymers**, v.2, p.201-208, 2005.
175. VIVAR, C.; DE LA ROSA, C.; MOSSO, A. Survival of *Staphylococcus aureus* in oral administration liquid medicaments and influence of count medium on survival. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.82, n.2, p.170-173, 1993.
176. WANG, J.; PAN, C.J.; HUANG, N.; SUN, H.; YANG, P.; LENG, Y.X.; CHEN, J.Y.; WAN, G.J.; CHU, P.K. Surface characterization and blood compatibility of poly(ethylene tetraphthalate) modified by plasma surface grafting. **Surface and Coatings Technology**, n.196, p.307-311, 2005.
177. WERNER, H.-P. Is the 'hydrogen peroxide plasma process' suitable for sterilisation? **Hygiene + Medizin**, v.9, p.387-388, Jan. 1995. [Editorial].
178. WEST, K.L. Ethylene oxide sterilization: a study of resistance relationships. In: GAUGHRAN, E.R.L.; GOUDIE, A.J., eds. **Sterilization of medical products by ionizing radiation**. Montréal: Multiscience Publication, 1978. p.109-168. (International Conference on the Sterilization of Medical Products by Ionizing Radiation, Vienna, Austria, April 25-28, 1977, sponsored by Johnson & Johnson).
179. XU, L.; TERASHITA, F.; NONAKA, H.; OGINO, A.; NAGATA, T.; KOIDE, Y.; NANKO, S.; KURAWAKI, I.; NAGATSU, M. Discharge conditions for CW and pulse-modulated surface-wave plasmas in low-temperature sterilization. **Journal of Physics D: Applied Physics**, n.39, p.148-152, 2006.
180. YANG, C.Q. Infrared spectroscopic analysis of textile materials degradation using photoacoustic detection. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.31, p.617-621, 1992.
181. YANG, C.Q.; BRESEE, R.R.; FATELEY, W.G. Near-surface analysis and depth profiling by FT-IR photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.41, n.5, p.889-896, 1987.
-

-
182. YANG, H.; YARAJ, J.I.; SAKHAMURI, S. Characterization of edible coatings and microorganisms on food surfaces using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.55, n.5, p.571-582, 2001.
 183. YOUNG, J.H. New sterilization technologies In: REICHERT, M.; YOUNG, J.H., eds. **Sterilization technology for a health care facility**. 2.ed. Gaithersburg: ASPEN, 1997. n.26, p.228-235.
 184. YU, L.S.L.; FUNG, D.Y.C. Five-tube most-probable number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p.97-106, 1993.
 185. YUE-E, F.; JUN, J.; CHAOXIONG, M. Study of radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate to chloroprene rubber membrane. **Radiation Physics and Chemistry**, v.54, p.159-163, 1999.
 186. ZREIQAT, H.; EVANS, P.; HOWLETT, C.R. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.44, p.389-396, 1999.

9. ANEXOS

Anexo 1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado e Doutorado

Anexo 2. Declaração de dispensa do Comitê de ética animal

Anexo 3. Apresentação de trabalhos em Congressos Nacionais e Internacionais

Anexo 1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado e Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta min.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta min para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta min para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta min por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo 2. Declaração de dispensa do Comitê de ética animal

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o trabalho não envolve experimentos com animais, e que por esta razão dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal.

São Paulo, 19 de março de 2007.

Débora Cristina de Oliveira

Aluna de doutorado n° USP 0490915

Prof^a. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Orientadora

Anexo 3. Apresentação de trabalhos em Congressos Nacionais e Internacionais

Microscopy analysis of biologic indicators exposure at inductively coupled plasma process

Autores: Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Boscariol, M.R.; Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Camponucci, A.M.; Pinto, T.J.A.; Moreira, A.J.

Evento: 5th Brazilian MRS Meeting

Local: Costão do Santinho Resort & SPA, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Período: 8 a 12 de outubro de 2005

Promoção: SBPMat – Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais

URL do evento: www.sbpmat.org.br/5encontro

Surface characterization of polymeric biomaterials processed by reactive ion etching (RIE) plasma sterilization

Autores: **Oliveira, D.C.**; Oliveira, A.M.; Moreira, A.J.; Boscariol, M.R.; Silva, J.M.F.; Pinto, T.J.A.; Mansano, R.D.; Ordonez, N.; Kawano, Y.

Evento: 120th AOAC International Annual Meeting and Exposition.

Local: Hyatt Regency, Minneapolis, Minnesota, USA

Período: 17 a 21 de setembro de 2006

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Comparative evaluation of ethylene oxide and low-temperature plasma sterilization technology

Autores: Silva, J.M.F.; Moreira, A.J.; Bonato, C.B.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Pinto, T.J.A.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.

Evento: 120th AOAC International Annual Meeting and Exposition.

Local: Hyatt Regency, Minneapolis, Minnesota, USA

Período: 17 a 21 de setembro de 2006

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Oxygen plasma as a means of medical device sterilization

Autores: Moreira, A.J.; Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Pinto, T.J.A.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.

Evento: 120th AOAC International Annual Meeting and Exposition.

Local: Hyatt Regency, Minneapolis, Minnesota, USA

Período: 17 a 21 de setembro de 2006

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Comparison of D value in Sterilization Methods by Ethylene oxide and plasma

Autores: Boscariol, M.R.; Silva, J.M.F.; Bonato, C.B.; **Oliveira, D.C.**; Moreira, A.J.; Pinto, T.J.A.; Mansano, R.D.; Ordonez, N.

Evento: 120th AOAC International Annual Meeting and Exposition.

Local: Hyatt Regency, Minneapolis, Minnesota, USA

Período: 17 a 21 de setembro de 2006

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Comparative effectiveness of O₂-H₂O₂ mixtures plasma sterilization technology

Autores: Silva, J.M.F.; Moreira, A.J.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: 66th Congress of FIP – World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2006

Local: Salvador, Bahia, Brazil

Período: 25 a 31 de agosto de 2006

Promoção: FIP

Surface characterization of polymeric biomaterials processed by reactive ion etching (RIE) plasma sterilization

Autores: Pinto, T.J.A.; **Oliveira, D.C.**; Oliveira, A.M.; Moreira, A.J.; Boscariol, M.R.; Silva, J.M.F.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.

Evento: 31st Annual Meeting of Society for Biomaterials

Local: David L. Lawrence Convention Center, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Período: 26 a 29 de abril de 2006

Promoção: Society for Biomaterials

URL do evento: www.biomaterials.org

Análise comparativa de oxigênio e peróxido de hidrogênio na redução da carga microbiana através de plasma por acoplamento indutivo.

Autores: Boscariol, M.R.; **Oliveira, D.C.**; Silva, J.M.F.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia

Local: Mendes Convention Center – Santos/SP

Período: 22 a 25 de novembro de 2005

Promoção: Sociedade Brasileira de Microbiologia

Eficácia comparativa entre sistemas de esterilização empregando plasma de oxigênio de diferentes origens

Autores: Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia

Local: Mendes Convention Center – Santos/SP

Período: 22 a 25 de novembro de 2005

Promoção: Sociedade Brasileira de Microbiologia

Effectiveness investigation of oxygen gas plasma sterilization using long and narrow-lumen medical devices as biological monitors.

Autores: **Oliveira, D.C.**; Oliveira, A.M.; Moreira, A.J.; Boscariol, M.R.; Silva, J.M.F.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP

Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Período: 17 a 21 de outubro de 2005

Promoção: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

URL do evento: www.fcf.usp.br

Esterilização por plasma de acoplamento indutivo

Autores: Boscariol, M.R.; **Oliveira, D.C.**; Moreira, A.J.; Silva, J.M.F.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP

Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Período: 17 a 21 de outubro de 2005

Promoção: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

URL do evento: www.fcf.usp.br

Efficacy studies of oxygen plasma sterilization technology

Autores: Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Oliveira, A.M.; Moreira, A.J.; Boscariol, M.R.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP

Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Período: 17 a 21 de outubro de 2005

Promoção: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

URL do evento: www.fcf.usp.br

Effectiveness investigation of oxygen gas plasma using an inductively coupled system against *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 spores

Autores: Boscariol, M.R.; **Oliveira, D.C.**; Silva, J.M.F.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: 119th AOAC International Annual Meeting and Exposition

Local: Orlando , Florida, USA

Período: 11 a 15 de setembro de 2005

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Studies of oxygen and hydrogen peroxide gas plasma parameters on the *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 spores destruction

Autores: Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Moreira, A.J.; Boscariol, M.R.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: 119th AOAC International Annual Meeting and Exposition

Local: Orlando , Florida, USA

Período: 11 a 15 de setembro de 2005

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org.

The efficacy study of hydrogen peroxide gas plasma against *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 spores inoculated in long and narrow lumen medical devices.

Autores: **Oliveira, D.C.**; Oliveira, A.M.; Moreira, A.J.; Boscariol, M.R.; Silva, J.M.F.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: 119th AOAC International Annual Meeting and Exposition

Local: Orlando , Florida, USA

Período: 11 a 15 de setembro de 2005

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Esterilização por plasma de acoplamento indutivo

Autores: Boscariol, M.R.; **Oliveira, D.C.**; Silva, J.M.F.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: XXVIII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada

Local: Santos, SP

Período: 10 a 14 de maio de 2005

Promoção: Sociedade Brasileira de Física

Sterilization by O₂ gas plasma: a study of its effectiveness against *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 spores inoculated in medical devices

Autores: **Oliveira, D.C.**; Vitalli, F.A.P.; Oliveira, A.M.; Silva, J.M.F.; Boscariol, M.R.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: 3rd International Symposium on Advanced Biomaterials/Biomechanics

Local: Holiday Inn Hotel, Montréal, Québec, Canada

Período: 03 a 06 de abril de 2005

Promoção: École Polytechnique de Montréal / École de Technologie Supérieure

URL do evento: www.congresbcu.com/isab2005

Sterilization systems using low-temperature gas plasma

Autores: Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: XVII Congreso Latino Americano de Microbiología / X Congreso Argentino de Microbiología

Local: Centro Cultural San Martín - Buenos Aires, Argentina

Período: 17 a 21 de outubro de 2004.

Promoção: Asociación Argentina de Microbiología

URL do evento: www.aam.org.ar

Estudos de eficácia de sistema esterilizante por plasma de oxigênio a baixa temperatura

Autores: Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Vitalli, F.A.P.; Moreira, A.J.; Mansano, R.D.; Pinto, T.J.A.

Evento: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP

Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – São Paulo/SP

Período: 18 a 22 de outubro de 2004.

Promoção: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

URL do evento: www.fcf.usp.br

Efficacy studies of oxygen plasma sterilization technology

Autores: Silva, J.M.F.; Vitalli, F.A.P.; **Oliveira, D.C.**; Pinto, T.J.A.; Moreira, A.J.; Mansano, R.D.

Evento: 118th AOAC International Annual Meeting and Exposition

Local: St. Louis, Missouri, USA

Período: 19 a 23 de setembro de 2004.

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.AOAC.org

The action of oxygen plasma on microbial strains: the influence of the process parameters

Autores: Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.; Silva, J.M.F.; Boscariol, M.R.; **Oliveira, D.C.**; Pinto, T.J.A.

Evento: 118th AOAC International Annual Meeting and Exposition

Local: St. Louis, Missouri, USA

Período: 19 a 23 de setembro de 2004.

Promoção: AOAC International – The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence

URL do evento: www.aoac.org

Esterilização por plasma de oxigênio

Autores: Silva, J.M.F.; **Oliveira, D.C.**; Boscariol, M.R.; Pinto, T.J.A.; Moreira, A.J.; Ordonez, N.; Mansano, R.D.

Evento: XXV CBRAVIC – Congresso Brasileiro de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência

Local: Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Período: 26 a 28 de julho de 2004

Promoção: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Sterilization by oxygen plasma

Autores: Silva, J.M.F.; Moreira, A.J.; Pinto, T.J.A.; Mansano, R.D.;
Oliveira, D.C.; Ordonez, N.

Evento: 16th International Vacuum Congress, 12th International Conference on surface Science, 8th International Conference on Nanometer-scale Science and Technology

Local: Veneza, Itália

Período: 28 de junho a 02 de julho de 2004

Promoção: Associazione Italiana Del Vuoto, International Union for Vacuum Science, Technique and Applications

A ação do plasma de oxigênio sobre cepas microbianas e a influência dos parâmetros de processo

Autores: Moreira, A.J.; Mansano, R.D.; Ordonez, N.; Silva, J.M.F.; Boscarol, M.R.; Oliveira, D.C.; Pinto, T.J.A.

Evento: XXVII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada

Local: Poços de Caldas - MG – Brasil

Período: 04 a 08 de maio de 2004

Promoção: Sociedade Brasileira de Física

São Paulo, 19 de março de 2007.

Débora Cristina de Oliveira
Aluna de doutorado n° USP 0490915

Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora